
Modelling- und Mutationsstudien an ausgewählten prenylierenden Enzymen



Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Herrn Diplom Biochemiker Lars Bräuer

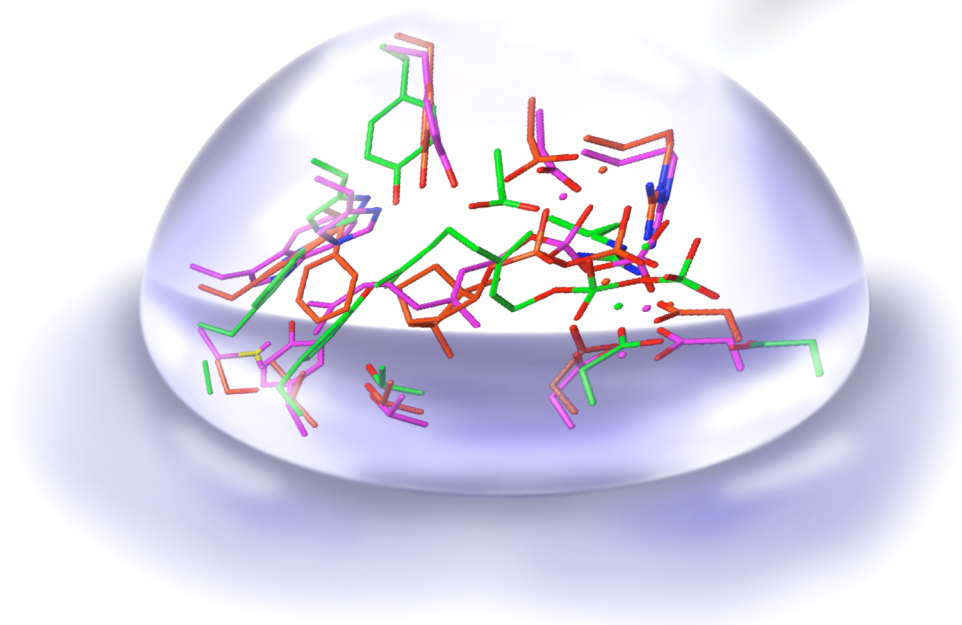
geb. am 25.02.1977 in Annaberg-Buchholz

Gutachter:

1. Dr. habil W. Brandt (Halle-Saale)
2. Prof. Dr. L. Heide (Tübingen)

verteidigt am 24.08.2006

**Modelling- und Mutationsstudien
an ausgewählten
prenylierenden Enzymen**



Lars Bräuer - Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie - 2006

Für die mir stets erwiesene Unterstützung und seinen,
in allen Fällen wertvollen Rat, danke ich
Herrn Dr. habil Wolfgang Brandt sehr herzlich.

Weiterhin danke ich Dir für die immer währende Bereitschaft zu Diskussionen, Hilfestellungen und Anregungen. Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle für den wissenschaftlichen Freiraum bedanken, welchen Du mir gelassen und damit zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hast. Für Deine Offenheit und Dein Vertrauen danke ich Dir ebenso wie für Dein Engagement bei der Bewilligung von nationalen und internationalen Konferenzen und Präsentationen. Letztere waren für mich sehr lehrreich und amüsant zugleich.

Prof. Ludger Wessjohann danke ich aufrichtig für die Aufnahme in seine Abteilung für Natur- und Wirkstoffchemie. Trotz der Tatsache, dass ich eigentlich kein Chemiker bin, fühlte ich mich dennoch immer sehr heimisch und willkommen. Ich danke Dir außerdem besonders für Dein stetes Interesse am Erfolg und Fortgang meiner Arbeit, die konstruktiven Diskussionen und für die zahlreichen nationalen und internationalen Konferenzen, Schulungen und Kolloquien, welche Du mir ermöglicht hast. Nicht zuletzt möchte ich mich für die Überlassung des hochinteressanten und sehr dynamischen Themas auf dem Gebiet der prenylierenden Enzyme bedanken.

Es ist mir ein ganz besonderes Bedürfnis an dieser Stelle Prof. Lutz Heide (Pharmazeutische Biologie der Eberhard Karls Universität Tübingen) für die Bereitschaft der Begutachtung dieser Arbeit zu danken. Außerdem danke ich Ihnen für Anregungen und Hinweise bezüglich des ubiA-Enzyms aus *E. coli* sowie für dessen Gen, welches Sie mir zur Verfügung stellten.

Nicht unerwähnt bleiben dürfen Roman Weber und Dr. Svetlana Zakharova. Euch beiden gilt mein besonderer Dank für die Hilfe bei der Analyse meiner mutierten Enzyme.

Institutsdirektor Prof. Dierk Scheel: Danke für die Bereitstellung von Labormaterial und Arbeitsplätzen in der Abteilung für Stress- und Entwicklungsbiologie. An dieser Stelle gilt mein Dank auch Pierre Tennstedt, welcher bereitwillig viele Pufferlösungen und Chemikalien mit mir geteilt hat. Dir danke ich auch für Hilfestellungen bei exotischen PCR-Versuchen.

Frau Prof. Toni Kutchan, welche Anfang 2006 einem Ruf nach St. Louis folgte, danke ich für die Überlassung der beiden Terpensynthasen aus *Cannabis sativa* und die Möglichkeit diese für meine Experimente uneingeschränkt nutzen zu dürfen. Nils Günnewich danke ich für seine anfängliche Hilfestellung bei Dye-Sequenzierungen.

Bei Dr. Angelika Schierhorn bedanke ich mich für MS-Analysen bezüglich des ubiA-Enzyms aus *E. coli*.

Ebenso danke ich Dr. Gerd Hause für seinen fünfmonatigen Exkurs in die Welt der Elektronenmikroskopie. Bedauerlicherweise musste dieses Projekt unvorhergesehen beendet werden. Ferner gilt mein Dank den Mitarbeitern der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie und in besonderem Maße meinen Kollegen aus dem Arbeitskreis Modelling für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Bedanken möchte ich mich auch bei Sylvia Pieplow, die sich freiwillig der Mühe der Erstkorrektur unterzog.

Besonderer Dank gebührt auch meinem besten Freund Mike Baldzuhn und meinem Onkel Peter (Entwicklung Titelbilddesign) sowie meiner Familie, für stete emotionale Unterstützung und allzeit ermutigende Worte.

Mein herzlichster Dank gilt natürlich meiner lieben Ehefrau Kathleen.

Ohne Dich wäre all das hier nicht möglich gewesen.

*„Wissenschaft ist Irrtum auf den letzten Stand gebracht.“
Linus Carl Pauling, Nobelpreis für Chemie 1954*

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	10
1.1.	Molecular Modelling	10
1.2.	Terpenoide.....	11
1.3.	Isopentenylidiphosphat Biosynthese.....	13
1.3.1.	Der Mevalonat-Weg (MVA-Weg).....	13
1.3.2.	Der Methylerythritolphosphat-Weg (MEP-Weg).....	15
1.4.	„Prenylierende Enzyme“	17
1.4.1.	Aromatische Prenyltransferasen	17
1.4.2.	Terpen-Zyklasen	19
1.4.3.	Isoprenyldiphosphat-Synthasen (IPPS).....	22
1.4.4.	Protein-Prenyltransferasen.....	23
1.5.	Zielstellung der Arbeit	25
2.	Materialien und Methoden.....	26
2.1.	<i>in silico</i> Methoden	26
2.1.1.	Molekülmechanik.....	26
2.1.2.	Quantenmechanik.....	27
2.1.3.	Die „Protein Data Bank“	28
2.1.4.	Biologische Datenbanken	29
2.1.5.	Strukturvorhersagen	29
2.1.6.	Alignments und multiple Alignments	30
2.1.7.	Modellierung und Evaluierung	30
2.1.8.	Software und Programmpakete.....	32
2.1.9.	Computersystem der Arbeitsgruppe Computerchemie	33
2.2.	<i>in vivo</i> / <i>in vitro</i> Methoden	34
2.2.1.	Bakterienstämme.....	34
2.2.2.	Plasmide	34
2.2.3.	Biologische Präparate.....	35
2.2.4.	Oligonukleotide.....	36
2.2.5.	Elektrophoresen	37
2.2.6.	Nukleinsäureisolierung und - präparation	39
2.2.7.	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	40
2.2.8.	Klonierungen	42
2.2.9.	Verdau mit Restriktionsenzymen.....	43
2.2.10.	DNA-Sequenzierung	44
2.2.11.	Proteinexpression	45

2.2.12.	Blot- und Färbetechniken	47
2.2.13.	Konzentrationsbestimmungen	49
2.2.14.	Herstellung von Medien und Agarplatten	50
3.	Resultate und Diskussionen	51
3.1.	Das ubiA-Enzym aus <i>E. coli</i>	51
3.1.1.	Suche nach homologen Proteinen und strukturellen Similaritäten	52
3.1.2.	Homologie Modelling und Strukturverfeinerung	55
3.1.3.	Docking-Studien und Charakterisierung möglicher aktiver Zentren	57
3.1.4.	Ein möglicher Katalysemechanismus	59
3.1.5.	Quantenmechanische Analyse der Substratspezifität des ubiA-Enzyms	63
3.1.6.	Punktmutationen an möglichen aktiven Zentren	67
3.1.7.	Zwei Hexahistidyl-Konstrukte	70
3.1.8.	Zusammenfassende Diskussion - Prenyltransferasen	71
3.2.	Zwei Terpensynthasen aus <i>Cannabis sativa</i>	74
3.2.1.	(-)-Limonen- und (+)- α -Pinen-Synthase	74
3.2.2.	Das Modellierungstemplate	75
3.2.3.	Homologie Modelling und Strukturverfeinerung	76
3.2.4.	Das aktive Zentrum	81
3.2.5.	Mutationsanalysen	83
3.2.6.	Produktanalyse	84
3.2.7.	Quantenmechanische Untersuchungen zum Katalysemechanismus	87
3.2.8.	Zusammenfassende Diskussion - Terpensynthasen	92
4.	Zusammenfassung	96
4.1.	Zusammenfassung der Ergebnisse	96
5.	Literaturverzeichnis	99
6.	Anhang	108

Abkürzungsverzeichnis

3-DMA-4-HB	3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoat
4-HB	4-Hydroxybenzoat
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BLOSUM	Blocks Substitutions Matrix
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CMK	Cytidyl-Methyl-Kinase
CMS	Cytidindiphosphat-Methylerythritol-Synthase
CsTps	<i>Cannabis sativa</i> Terpensynthesen
CTP	Cytidintriphosphat
DDBJ	DNA Data Bank of Japan
DMA	Dimethylallyl
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DOXP syn. DXP	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat
DXR	1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktase
DXS	Deoxyxylulosephosphat-Synthase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMBL	European Molecular Biology Laboratory
FPP	Farnesyldiphosphat
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektroskopie
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GGPPS	Geranylgeranyldiphosphat-Synthase
GOLD	Genetic Optimized Ligand Docking
GPP	Geranyldiphosphat
GPPS	Geranyldiphosphat-Synthase
HDS	3-Hydroxy-4-methyl-3-butenyl-diphosphat-Synthase
HIV	Humane Immunodeficiency Virus
HMG	Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA
HMGR	HMG-CoA-Reduktase
HMGS	HMGl-CoA-Synthase
IDI	IPP-Isomerase
IDS	IPP/DMAPP-Synthase
IPP	Isopentenylidiphosphat

IPPS	Isopentenylidiphosphat-Synthase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LB	Luria-Bertani
LPP	Linalyldiphosphat
LS	Limonen-Synthase
MALDI-MS	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-MS
MCS	Methyl-erythritol-cyclo-diphosphat-Synthase
MEP	Methylerythritolphosphat
MM	Molekülmechanik
MOE	Molecular Operating Environment
MS	Massenspektrometrie
MVA	Mevalonsäure
MVK	Mevalonat-5-Phosphotransferase
MVPP	Mevalonat-5-diphosphat
NADPH	Nicotinamidadeninukleotidphosphat (reduzierte Form)
Ni-NTA	Nickel-nitrilotriacetat
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	Open Reading Frame
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDB	Protein Data Bank
PM3	Parametrized Method 3
PMD	Pyrophosphomevalonat-Decarboxylase
PMK	Phosphomevalonat-Kinase
PP	Diphosphat
PS	Pinen-Synthase
QM	Quantenmechanik
QM/MM	Quantenmechanik/Molekülmechanik
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TMHMM	TransMembran (Prediction) Hidden-Markov-Model

1. Einleitung

Die Terpenoide stellen mit über 30.000 bekannten Vertretern die wohl größte und zugleich auch eine sehr heterogene Klasse der Naturstoffe dar, wobei prenylierte Verbindungen diese Anzahl mindestens noch verdoppeln. Es ist also nicht verwunderlich, dass die Klassen der Terpene synthetisierenden Enzyme ebenso zahlreich wie divers sind. Prinzipiell lassen sich prenylierende Enzyme nach verschiedenen Gesichtspunkten unterscheiden, sei es nach Art der katalysierten Reaktion, ihrer zellulären Lokalisation oder nach EC-Nomenklatur. Zwei außerordentlich interessante Gruppen werden von den aromatischen Prenyltransferasen und den Terpenzyklasen repräsentiert. Während für letztere bereits umfangreiche Charakterisierungen und zum Teil sogar Röntgenkristallstrukturen existieren, sind die aromatischen, membrangebundenen Prenyltransferasen weniger gut beschrieben. Es besteht daher ein großer Bedarf, Katalysemechanismen zu verstehen und das immense Produktspektrum, durch welches sich insbesondere die Terpenzyklasen auszeichnen, nachvollziehen zu können. Nicht zuletzt die biokatalytische C-C-Bindungsknüpfung, wie durch die meisten Prenyltransferasen vermittelt, ist von enormem Interesse für die chemische Forschung – sind derartige Reaktionen doch nur unter sehr anspruchsvollen und unphysiologischen Bedingungen zu realisieren.

Molecular Modelling kann helfen, Einblicke in die dreidimensionale Struktur und Dynamik dieser Enzyme zu erlangen und ein besseres Verständnis für ablaufende biochemische Prozesse zu entwickeln. Darüber hinaus würde die Kombination aus theoretischen und experimentellen Methoden erlauben, durch Modifikationen und Mutationen Produkt- bzw. Substratspezifitäten gezielt zu verändern. Die sich daraus ableitende Konsequenz ist die Anpassung des Einsatzspektrums der Proteine auf spezielle Problemstellungen, wie beispielsweise die rekombinante Produktion schwer zugänglicher Verbindungen.

1.1. Molecular Modelling

Lange Zeit galt die klassische Chemie als rein experimentelle Wissenschaft. Doch nicht allein aufgrund der Entwicklung exponentiell leistungsfähiger Rechensysteme und potenter Software ist Molecular Modelling zu einem mächtigen Werkzeug für Forschung und Entwicklung geworden. Dessen vorläufiger Höhepunkt wird durch den 1998 verliehenen Nobelpreis für Chemie widerspiegelt. Die honorierten Naturwissenschaftler W. Kohn und

J. Pople waren maßgeblich an der Entwicklung der Dichte-Funktional-Theorie und der Computergestützten Umsetzung der Quantenchemie beteiligt [1;2]. Mittlerweile haben sich die Methoden des Molecular Modelling so stark etabliert, dass diese weder aus der industriellen, noch aus der akademischen Forschung wegzudenken sind. Dort spielen neben der Vorhersage von chemischen oder molekularen Eigenschaften oder der Entwicklung von Medikamenten auch die Modellierung und Bearbeitung von Proteinstrukturmodellen eine zentrale Rolle.

Ungeachtet aller Vorteile, die sich aus den unterschiedlichen Techniken ergeben, stößt man trotz intensiver Weiterentwicklung der Methoden häufig an deren Grenze. Sei es bei der Simulation von polymeren Systemen, bei der Betrachtung enzymatischer Reaktionen oder bei der Erstellung von komparativen Homologiemodellen - wie sich in der hier vorliegenden Arbeit erwies. Eine präzise und dabei zugleich sehr informationsdichte Übersicht über den derzeitigen Erkenntnisstand bietet der Artikel „Homology Modelling“ von E. Krieger [3].

1.2. Terpenoide

Mit mehreren zehntausend Vertretern bilden die Isoprenoide die wohl vielfältigste Stoffklasse in der Natur überhaupt [4]. Den Grundbaustein aller Isoprenoide bildet, allerdings rein formal, 2-Methyl-1,3-butadien, welches auch als Isopren bezeichnet wird. Die Oligomerisation mehrerer solcher Isoprene führt letztendlich zu den unterschiedlichsten Isoprenoiden [5]. Man kann prinzipiell zwischen reinen Isoprenoiden, zu denen beispielsweise die Carotinoide und Sterole gehören, und zusammengesetzten Isoprenoiden unterscheiden. Letztere bestehen aus Isoprenen und Nicht-isoprenoiden Bestandteilen, z.B. Chlorophyll oder prenylierte Chinone [6]. Die Entdeckung des zellulären Isopren-Äquivalents, welches in seiner phosphorylierten Form identifiziert wurde, lässt sich auf Arbeiten von Lynen und Bloch et al. gegen Ende der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts zurückführen [7;8]. Der Hauptteil der natürlichen Isoprenoide nimmt einen zentralen Stellenwert im Sekundärmetabolismus von Pflanzen ein. Nicht zuletzt ihre essentielle Bedeutung als Vitamine (fettlösliche Vitamine A, E, K), sondern auch ihre Funktion als Duftstoffe, Bakterizide oder Pharmazeutika (z.B. Taxol) machen die Isoprenoide unabhömmlich und zu einem begehrten Untersuchungsobjekt.

Durch den von Lichtenthaler 1997 abgeleiteten Biosyntheseweg in Pflanzen, welcher ohne Mevalonsäure zur Bildung von Isoprenoiden führt, ergaben sich zahlreiche Angriffspunkte in der Modifikation und Inhibierung beteiligter Enzyme [9].

Die einfachen, nicht zusammengesetzten Isoprenoide kann man in Hemi-, Mono-, Sesqui-, Di-, Tri- und Polyterpene klassifizieren. Dabei bezieht sich die Nomenklatur auf die Anzahl der C₅-Grundstrukturen. Sowohl zyklische, als auch olefinische Mono-, Sesqui- und Diterpene sind Hauptbestandteil von ätherischen Pflanzenölen und dienen der Pathogenabwehr oder der Chemotaxis von Insekten. Zu den bedeutendsten Diterpenen zählen Gibberellin und Phytol, wobei Phytol häufig als isoprenoide Komponente bei den zusammengesetzten Isoprenen zu finden ist. Es bildet beispielsweise die Seitenkette des Phyllochinons (Vitamin K₁). Eine weitere wichtige, den Isoprenoiden zugehörige und von Triterpenen abgeleitete Substanzklasse sind die Sterole. Neben ihrer Funktion bei der Stabilisierung von biologischen Membranen bilden sie den Ausgangspunkt für weitläufige Modifikationen, welche letztlich zu den Steroiden z.B. zu Cholesterin führen. Den größten Anteil an bekannten pflanzlichen Sterolen haben Sitosterol, Stigmasterol und Campesterol, wobei sich von letzterem die Brassinosteroide ableiten [10]. Jedoch nicht nur tetrazyklische, sondern auch pentazyklische Triterpene (z.B. Saponin), welche meist mit Kohlenhydraten oder Alkaloiden substituiert sind, stellen wichtige pflanzliche Isoprenoide dar. Die wohl bedeutsamsten, tetraterpenoiden Vertreter sind die Carotinoide. Sie sind stark in die Photosynthese eingebunden und transferieren Lichtenergie auf die jeweiligen Reaktionszentren. Als wichtigstes und kommerziell weit verbreitetes Polypren (polymeres Isopren) sollte Kautschuk aufgeführt werden, welcher aus 5.000 bis 100.000 Isopreneinheiten aufgebaut ist.

Zu den zusammengesetzten Isoprenoiden gehört das Ubichinon, welches als respiratorischer Elektronenüberträger in allen aeroben Eu- und Prokaryonten zu finden ist. Auf Ubichinon, bzw. dessen Herkunft wird im Kapitel 1.4.1. näher eingegangen. Ein zusammengesetztes, von Pflanzen synthetisiertes Isoprenoid ist das α -Tocopherol (Vitamin E). Diesem kommt als so genannter Radikalfänger besondere pharmakologische aber auch kosmetische Bedeutung zu. Prenylseitenketten finden sich auch bei tRNA-Molekülen und in Form von prenylierten Proteinen, welche hauptsächlich regulatorische Funktionen aufweisen. (siehe 1.4.4.)

1.3. Isopentenylidiphosphat Biosynthese

In den späten 50er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde ein klassischer Weg zur Biosynthese von Isoprenen in Tieren und Hefe entdeckt [7;11]. Dieser bildet ausgehend von Acetat ein diphosphoryliertes Mevalonsäureintermediat und wird dementsprechend als MVA-Weg bezeichnet. Über Markierungsversuche und Expression der entsprechenden Gene wurde das Biosyntheschema auf Pflanzen übertragen und konnte dort zumindest für Sterole bestätigt werden [6].

1.3.1. Der Mevalonat-Weg (MVA-Weg)

Im ersten Schritt, des in Abbildung 1 dargestellten MVA-Weges erfolgt vermittelt durch eine **Thiolase** die Claisen-Thioester-Kodensation zweier Acetyl-CoA zu Acetoacetyl-CoA. Nach Kondensation eines weiteren Acetyl-CoA durch Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase (**HMGS**) entsteht Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA, welches katalysiert durch HMG-CoA-Reduktase (**HMGR**) zu R-Mevalonat reduziert. Mevalonat-5-phosphotransferase (**MVK**) und Phosphomevalonat-Kinase (**PMK**) diphosphorylieren unter Aufwendung von 2 ATP Mevalonat zu Mevalonat-5-diphosphat (MVPP). Eine anschließende Decarboxylierung durch die Pyrophosphomevalonat-Decarboxylase (**PMD**) führt schlussendlich zu IPP, welches über die IPP-Isomerase (**IDI**) im Gleichgewicht mit DMAPP steht [12;13].

Alle Enzyme des Acetat/MVA-Weges konnten aus Pflanzen kloniert werden, z. B. die Acetoacetyl-CoA-Thiolase (**Thiolase**) aus *Raphanus sativus* [14], HMG-CoASynthase (**HMGS**) [15], Phosphomevalonat-Kinase (**PMK**) [16] und Pyrophosphomevalonat-Decarboxylase (**PMD**) [17] aus *Arabidopsis thaliana* und Phosphomevalonat-Kinase (**PMK**) aus *Catharantus roseus* [18].

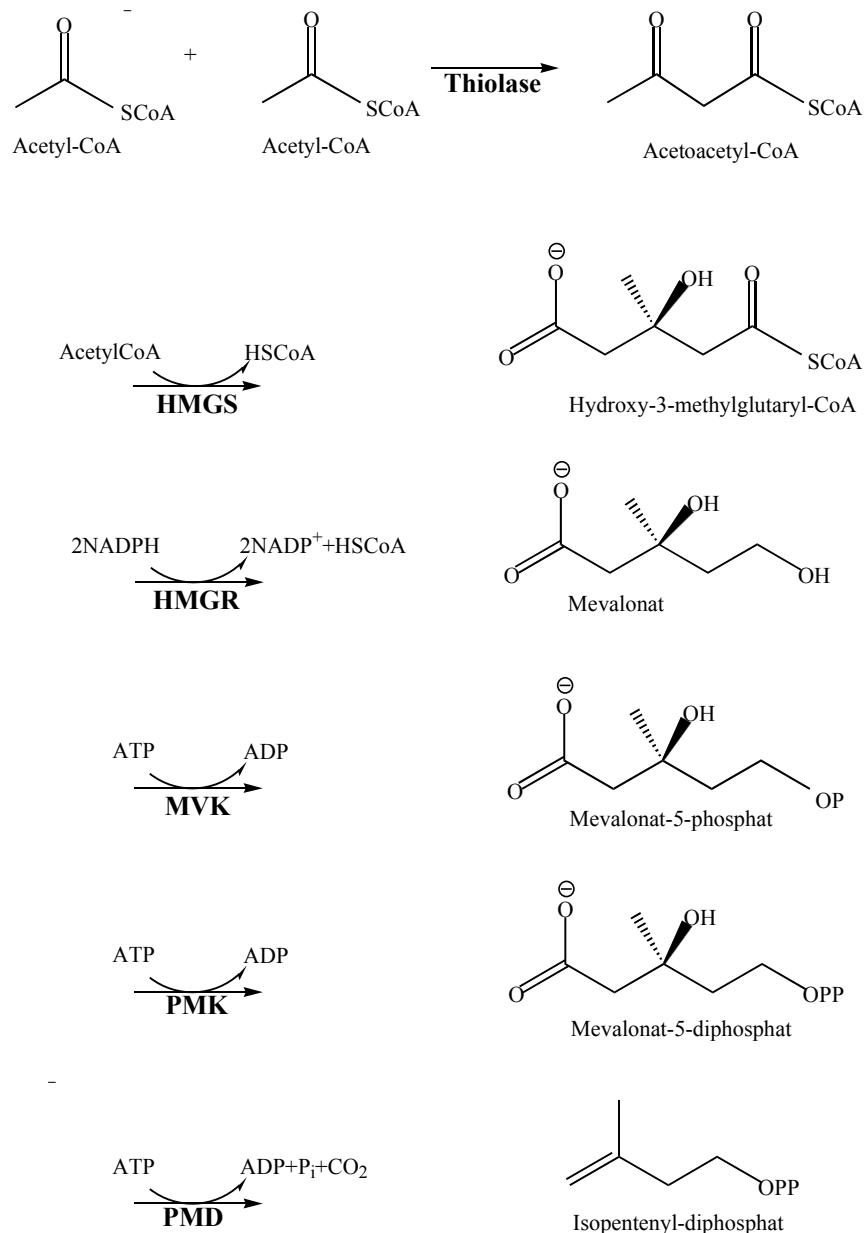


Abbildung 1: Schematischer Reaktionsmechanismus des Mevalonat-Weges ausgehend von Acetyl-CoA zum Isopentenyldiphosphat mit folgenden involvierten Enzymen: HMGS (Hydroxymethylglutaryl-CoA-Synthase), HMGR (HMG-CoA-Reduktase), MVK (Mevalonat-5-Phosphotransferase), PMK (Phosphomevalonat-Kinase), PMD (Pyrophosphomevalonat-Decarboxylase)

Untersuchungen der pflanzlichen HMG-CoA-Reduktase (HMGR) zeigen zwei evolutionär konservierte Sequenzbereiche, welche das Enzym mit dem endoplasmatischen Retikulum verankern. Es muss also davon ausgegangen werden, dass HMGR nur im Cytosol aktiv ist [19]. Zusätzlich fehlt eine Chloroplasten-Transitpeptid-Region, welche für einen Transport in den Chloroplasten unabhömmlich ist. [20]. Diese und weitere Diskrepanzen, beispielsweise in Hinblick auf die IPP-Versorgung des Chloroplasten [21], ließen starke Zweifel am klassischen MVA-Weg aufkommen. Schließlich gelang es einen Mevalonsäureunabhängigen Weg, durch

die Klassifizierung der beteiligten Enzyme aufzuzeigen [22]. Dieser hat auch heute noch unter dem Namen seiner gebildeten Intermediate 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat (DOXP-Weg) oder 3-Methyl-D-erythritol-phosphat (MEP-Weg) allgemeine Gültigkeit. In Abbildung 2 ist der Ablauf der Biosynthese von DMAPP oder IPP über den MEP-Weg schematisch dargestellt. Während die meisten Eubakterien nur über den MEP-Weg verfügen, benutzen Pflanzen beide Wege. Entsprechende Modelle zur Kompartimentierung der Isoprenoid-Biosynthese in Pflanzen sind durch Lichtenthaler beschrieben [9]. Demnach nutzen Pflanzen den MEP-Weg in den Chloroplasten und den MVA-Weg im Cytosol.

1.3.2. Der Methylethritolphosphat-Weg (MEP-Weg)

Der MEP-Weg, in Abbildung 2 schematisch illustriert, geht vom Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat aus, welche über die Deoxyxylulosephosphat-Synthase (**DXS**) zu 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat verknüpft werden [23]. DXP, außerdem in der Pyridoxal- und Thiaminbiosynthese involviert, wird durch die DXP-Reduktase (**DXR**) zu 3-Methyl-D-erythritol-phosphat - seinerseits mit Cytidintriphosphat (durch CMS) aktiviert - reduziert. Das entstandene Citidyl-3-Methyl-D-erythrityl-diphosphat wird durch ATP und die Cytidyl-Methyl-Kinase (**CMK**) zu Diphosphocytidyl-3-methyl-D-Erythrityl-diphosphat phosphoryliert. Bei der folgenden Reaktion (durch Methyl-Erythritol-Zyko-Diphosphat-Synthase (**MCS***) katalysiert) entsteht unter Abspaltung von Cytidinmonophosphat ein zyklischer Phosphosäureester zwischen C₂ und C₄. Als Intermediat geht 3-Methyl-D-erythrityl-1,3-zyklodiphosphat aus dieser Reaktion hervor. Durch Hydroxy-Methyl-Butenyl-Diphosphat-Synthase (**HDS**) vermittelt kann die Umsetzung zu (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat erfolgen. Ein entsprechender Mechanismus zur Spaltung der zyklischen Verbindung wurde von Brandt et al. postuliert [24]. (E)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat wird letztendlich durch IPP/DMAPP-Synthase (**IDS**) zu IPP und DMAPP umgesetzt.

* Nach jüngsten Untersuchungen (02/2006) konnte die dreidimensionale Struktur der MCS durch Röntgenbeugung (X-Ray) aufgeklärt werden [25].

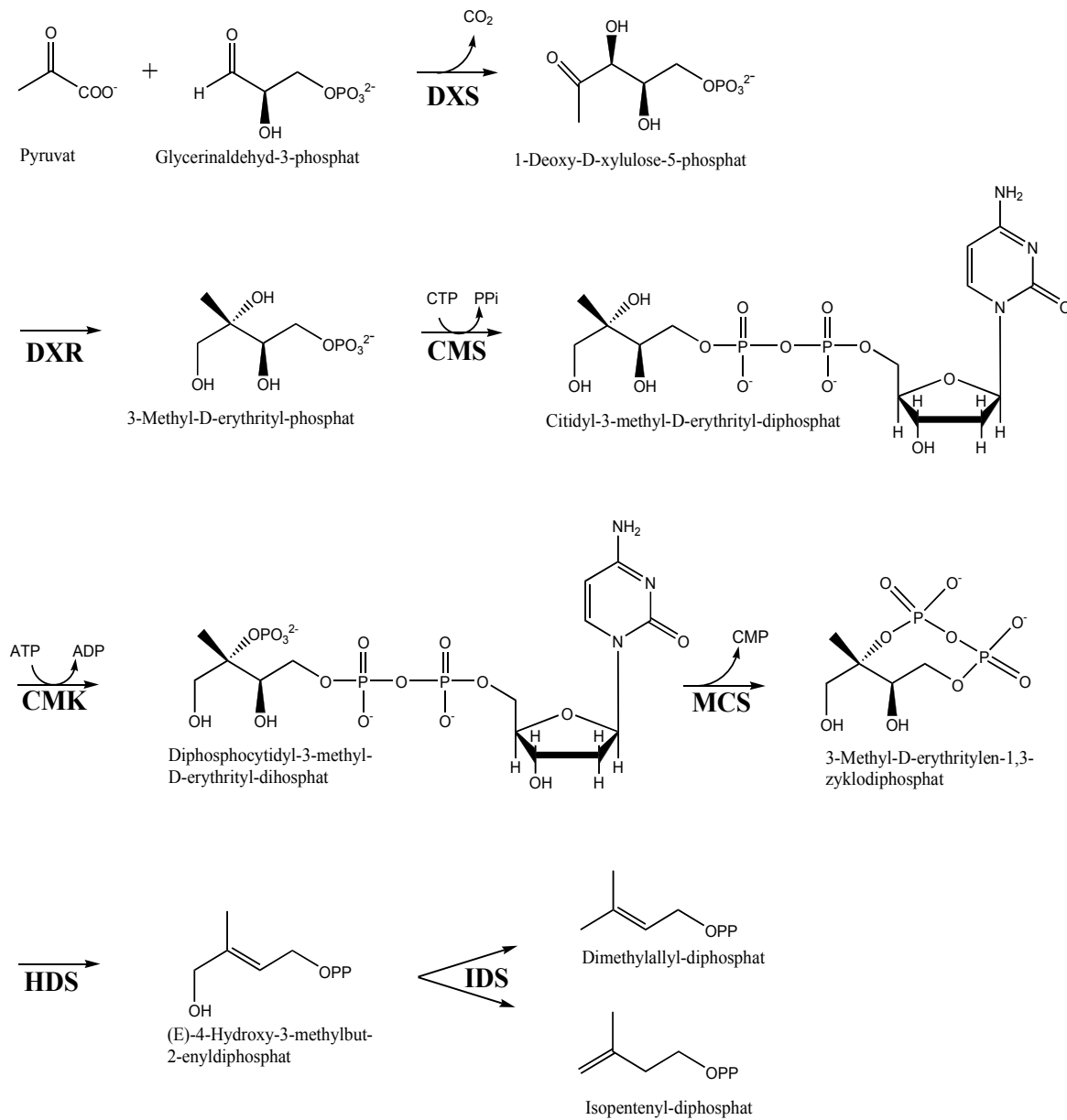


Abbildung 2: Der Methylerythritolphosphatweg ausgehend von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat zu DMAPP und IPP mit den folgenden involvierten Enzymen: DXS (Deoxyxylulosephosphat-Synthase), DXR (DXP-Reduktase), CMS (Cytidindiphosphat-Methylerythritol-Synthase), CMK (Cytidyl-Methyl-Kinase), MCS (Methyl-Erythritol-Zyklo-Diphosphat-Synthase), HDS (Hydroxy-Methyl-Butenyl-Diphosphat-Synthase), IDS (IPP/DMAPP-Synthase)

Sie zeichnet sich, wie fast alle enzymatischen Reaktionen durch ihre physiologischen Reaktionsbedingungen und durch ihre hervorragende Selektivität aus. Sehr häufig wird für die Bindung des Prenyldiphosphats bzw. dessen Aktivierung im aktiven Zentrum des Enzyms Magnesium oder Mangan benötigt. Die prenylierten Aromaten durchlaufen meist noch zahlreiche weitere biochemische Modifikationen, ehe sie ihre zentrale Funktion im jeweiligen Organismus einnehmen. Dabei fungieren sie als Elektronenübertragungssystem (Ubichinon, Menachinon, Tocopherol – in Abbildung 4 dargestellt) oder bilden die Grundlage vieler Metaboliten des Sekundärstoffwechsels von Pflanzen, Pilzen und Bakterien.

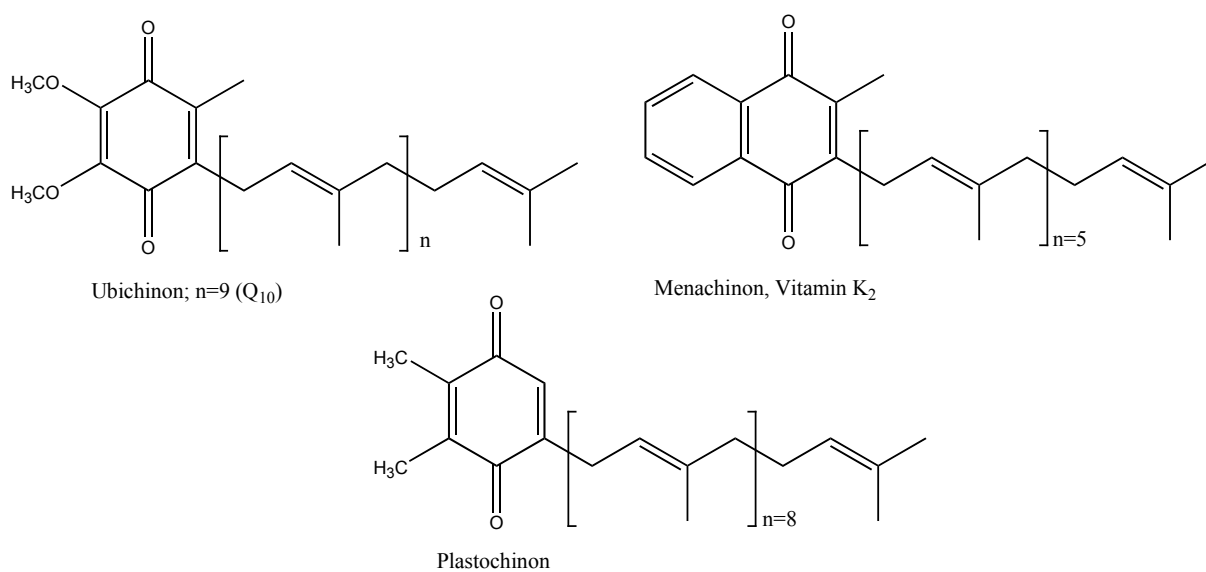


Abbildung 4: Verschiedene chinoide Systeme, deren Vorstufen aus aromatischen Prenylierungen hervorgehen

Obgleich aromatische Prenyltransferasen ubiquitär vorkommen und viele von ihnen zumindest bezüglich ihrer DNA-Sequenz identifiziert sind, existieren bisher nur wenige enzymologische Charakterisierungen oder gar röntgenkristallographische, dreidimensionale Strukturen. Die vor kurzem aufgeklärte Struktur einer aromatischen Prenyltransferase aus *Streptomyces sp.* stellt die bislang einzige Ausnahme dar [27]. Das mag zum Teil daran liegen, dass viele bisher analysierte aromatische Prenyltransferasen membrangebunden und daher schwer zugänglich sind.

Eine wichtige Gemeinsamkeit ist die hoch konservierte Diphosphatbindungsstelle, welche durch das Sequenzmotiv N/DDxxD ausgezeichnet ist [28]. Dieses Motiv ist dem der *trans*-Prenyltransferasen sehr ähnlich und ein evolutionär gemeinsamer Ursprung kann bereits hier vermutet werden [29]. Eine äußerst interessante und schon 1972 in Zellextrakten von *E. coli*

entdeckte aromatische Prenyltransferase stellt die 4-Hydroxybenzoesäure-oligoprenyltransferase dar, welche aus 290 Aminosäuren besteht [30]. Das entsprechende Gen *ubiA* konnte durch Nishimura et al. auf der physischen Karte von *E. coli* lokalisiert und zugeordnet [31] und durch Heide et al. bzw. Nichols et al. kloniert werden [32;33]. Eine Solubilisierung des membranassoziierten Enzyms führt rasch zu irreversiblen Aktivitätsverlusten und erschwert eine Aufreinigung und enzymkinetische Analysen ungemein. Dennoch wurde das *ubiA*-Enzym bereits erfolgreich zur biokatalytischen Knüpfung verschiedener C-C-Bindungen eingesetzt, welche klassisch-chemisch wohl nur schwer zugänglich wären [34]. Das native Produkt des Enzyms ist eine direkte Vorstufe von Ubichinonen variabler Kettenlänge (Coenzyme Q_n) und entsprechend an respiratorischen Prozessen beteiligt. Dessen spezifische Inhibierung kann demnach die Zellatmung und als Folge dessen auch das Wachstum des betreffenden Organismus stark beeinflussen.

Sowohl mechanistische als auch synthetisch-chemische Gesichtspunkte machen aromatische Prenyltransferasen zu einem begehrten Untersuchungsobjekt, nicht nur für die Synthesechemie.

1.4.2. Terpen-Zyklasen

Seit der Antike werden „aromatische“ Pflanzen wegen ihrer angenehmen Düfte, ihres kulinarischen Potentials oder ihres medizinischen Anwendungsspektrums geschätzt. Diese wertvollen Eigenschaften leiten sich hauptsächlich von Naturstoffen terpenoiden Ursprungs ab. In Pflanzen haben Terpene unter anderem regulatorische und kommunikative Funktionen oder dienen zum Schutz gegen Pathogene oder Fraßfeinde. Die strukturell sehr diversen Verbindungen resultieren aus Sekundärstoffwechselwegen, deren Hauptbestandteil eine beträchtliche Gruppe von prenylierenden Enzymen bildet: die Terpensynthasen. Es handelt sich dabei um eine Enzymklasse, welche sich durch eine Vielzahl von Unterfamilien auszeichnet und deren überwiegender Anteil durch Zyklasen repräsentiert wird. Ausgehend von wenigen, strukturell sehr einfachen Substraten (beispielsweise GPP) katalysieren diese Enzyme Zyklisierungsreaktionen, welche zu einer immensen Produktvielfalt führen. Es werden dabei mono-, bi-, tri- und sogar tetrazyklische Systeme synthetisiert.

Die Gruppe der Monoterpen-Synthasen nutzt GPP als Substrat, wohingegen Sesquiterpen-Synthasen FPP und Diterpen-Synthasen GGPP umsetzen. Momentan sind etwa 1000 Monoterpene, mehr als 7000 Sesquiterpene und ca. 3000 Diterpene bekannt. Alle derzeit untersuchten Terpensynthasen verfügen über ein Aspartatreiches Sequenzmotiv, welches aber nicht zwingend dem Typ N/DDxxD entsprechen muss. Beispielsweise erfolgt die Aktivierung und Orientierung des Prenyldiphosphats in der Kristallstruktur der Squalen-Synthase über ein DxDD-Motiv [35]. Die Komplexierung des Substrats wird über bivalente Metallionen (Mg^{2+} , Mn^{2+}) vermittelt.

Nach dem Kompartimentierungsschema für Pflanzen finden sich Monoterpen- und Diterpen-Synthasen, sowie deren substratliefernde Enzyme (GPPS und GGPPS) in den Plastiden, wohingegen Sesquiterpen-Synthasen überwiegend im Cytosol lokalisiert sind [9]. Alle Monoterpen-Synthasen verfügen über die Erkennungssequenz RR(x)₈W, welche einen essentiellen Einfluss auf die native Faltung des Enzyms hat [36].

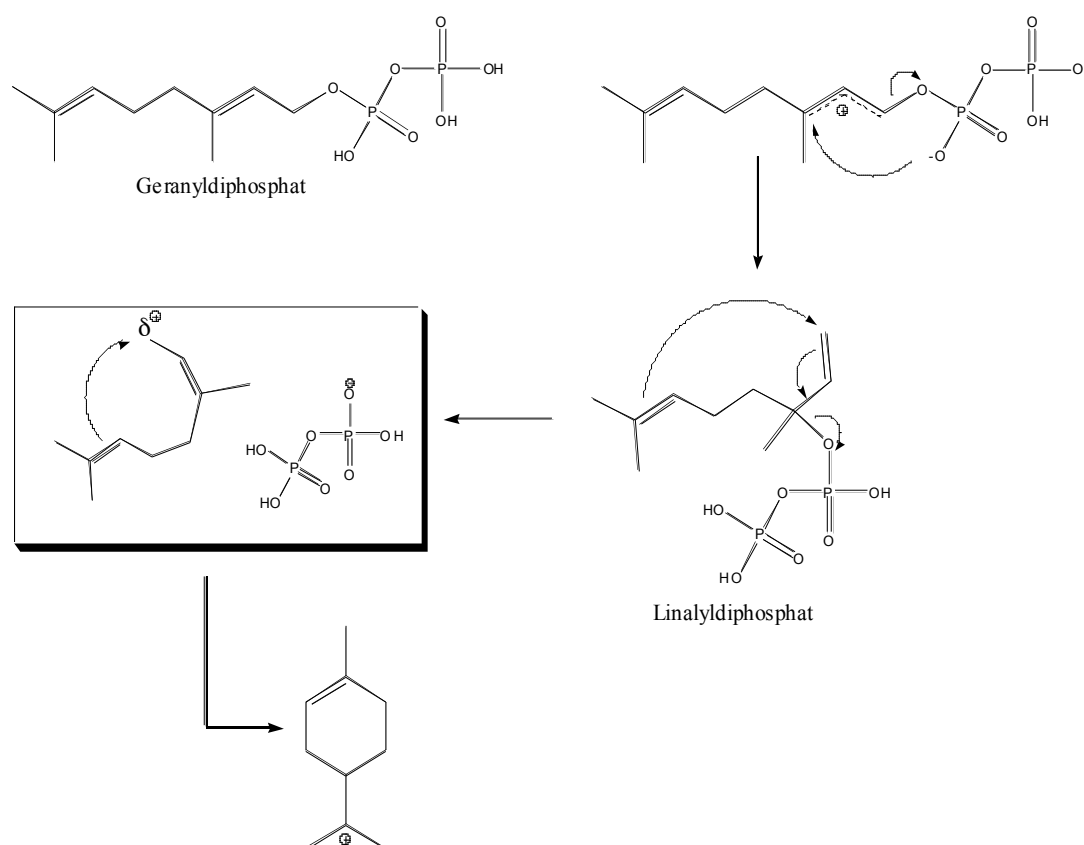


Abbildung 5: Schematischer Mechanismus der Zyklisierung von GPP über Linalyldiphosphat zum Terpinyl-Kation. Modifiziert nach Hyatt und Croteau

Die Ausgangssubstanz der Monoterpene ist das azyklische GPP, welches nach Croteau zum Linalyldiphosphat (LPP) isomerisiert und anschließend zu einem Terpinyl-Kation zyklisiert wird. Die schematische Reaktion bis zum Terpinyl-Kation, welche einer Wagner-Meerwein-Umlagerung entspricht ist in Abbildung 5 wiedergegeben, wobei der genaue Zyklisierungsmechanismus bis heute noch nicht komplett verstanden ist [37]. Die meisten Monoterpen-Synthasen bilden nicht nur ein Produkt. Vielmehr stellt nach Hyatt et al. das Terpinyl-Kation ein zentrales Intermediat für eine Vielzahl von zyklischen Monoterpenen dar [38]. Eine kleine Auswahl möglicher Monoterpene, ausgehend vom Terpinyl-Kation ist in Abbildung 6 gezeigt.

Linalyldiphosphat bildet den Ausgangspunkt für eine Reihe von azyklischen Produkten. Nicht nur die Monoterpen-Synthasen, sondern beispielsweise auch Sesquiterpen-Synthasen synthetisieren neben einem prominenten Hauptprodukt eine Fülle von Nebenprodukten [39].

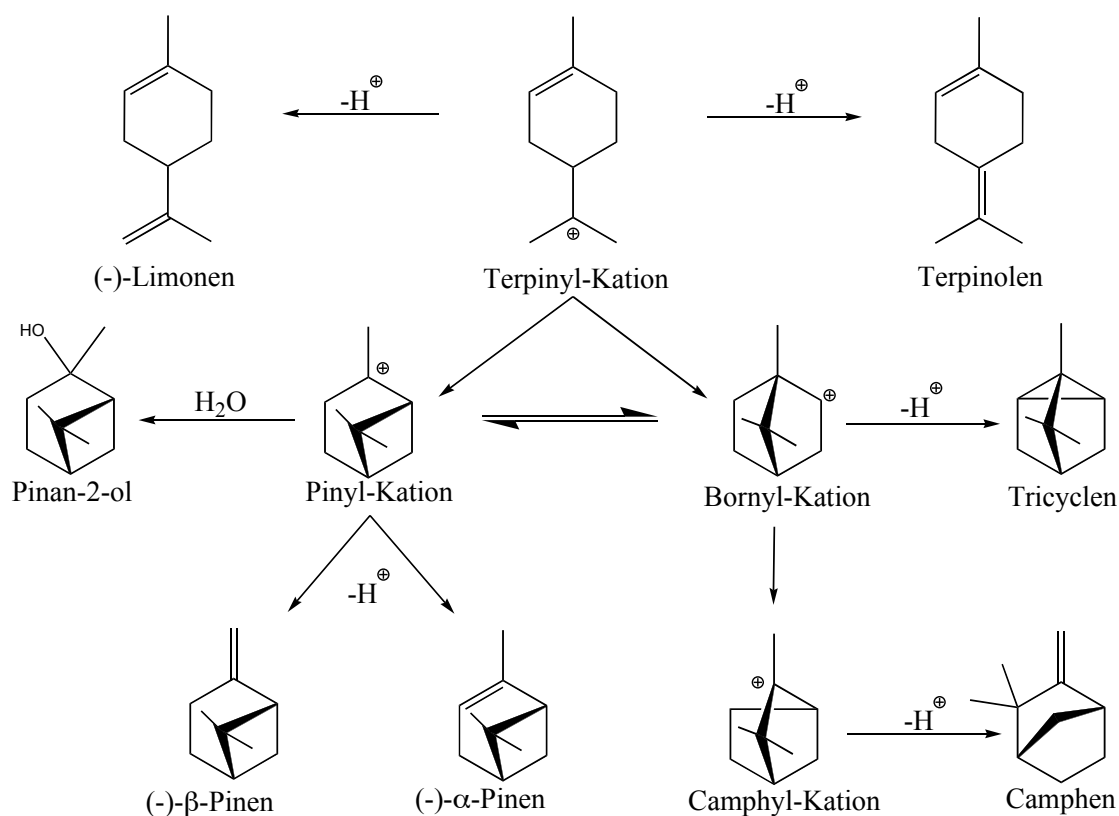


Abbildung 6: Eine Auswahl zyklischer Monoterpene, welche ausgehend von einem Terpinyl-Kation gebildet werden können. Die Stereochemie am C-1 des Pinan-2-ol ist noch nicht aufgeklärt. Modifiziert nach Hyatt und Croteau 2005

1.4.3. Isoprenyldiphosphat-Synthasen (IPPS)

Diese Familie von prenylierenden Enzymen, welche im Grunde genommen den Transfer von IPP auf DMAPP oder auf längere Substrate katalysieren, kann man in zwei große Gruppen unterteilen: *cis*- und *trans*-Isoprenyldiphosphat-Synthasen

In den letzten Jahrzehnten wurden viele *trans*-IPPS gereinigt, klassifiziert, die entsprechenden Gene kloniert und zugehörige Röntgenkristallstrukturen aufgeklärt [40;41]. Betrachtet man multiple Alignments verschiedener *trans*-Isoprenyldiphosphat-Synthasen, zeichnen sich deutlich zwei N/DDxxD-Motive ab, welche an der Komplexierung der jeweiligen Substrate beteiligt sind. Weiterhin existieren zahlreiche Mutationsstudien, die belegen, dass aromatische Aminosäuren (hauptsächlich Tyrosin und Phenylalanin) in der Bindungstasche des Enzyms die Kettenlänge des Produktes determinieren [42]. Im Gegensatz zu den *trans*-IPPS, fehlt den *cis*-Typen das charakteristische N/DDxxD-Motiv, obgleich auch diese Mg^{2+} für die Prenylierung benötigen. Dennoch sind konservierte Bereiche innerhalb der *cis*-Isoprenyldiphosphat-Synthasen eindeutig identifizierbar [43]. Ein Reaktionsmechanismus für *trans*-IPPS wurde bereits Ende der 1970er Jahre vorgeschlagen [44]. Dieser geht von der Bildung eines Carbokations (Abbildung 7) aus, welches aus der Spaltung des Prenyldiphosphats resultiert. Ein elektrophiler Angriff des 1'-Allylkations am IPP kann durch ein tertiäres Carbokation am C3-Kohlenstoff des Isopentenylidiphosphats stabilisiert werden. Der Reaktionsmechanismus für *cis*-IPPS ist weniger gut untersucht. Es ist aber davon auszugehen, dass *cis*-IPPS einer ähnlichen Kondensationsreaktion folgen.

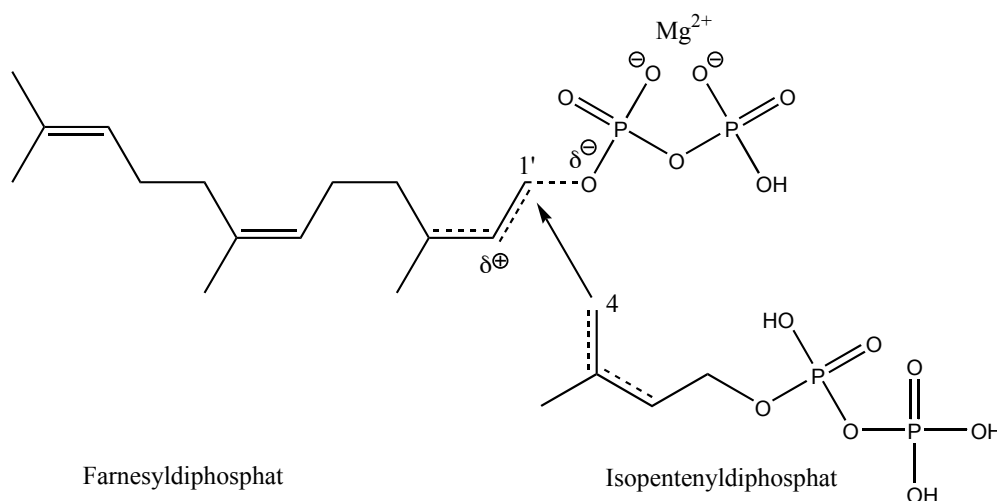


Abbildung 7: Schematischer Übergangszustand für *cis*-IPPS mit gebildetem Carbokation

Eine Unterscheidung der einzelnen Synthesen bezüglich ihres Reaktionsortes oder ihrer Quartärstruktur ist möglich. So ist die hexamere Geranylgeranyldiphosphat-Synthase, deren Struktur erst kürzlich aufgeklärt wurde (Kavanagh et al., nicht veröffentlicht), normalerweise in den Plastiden lokalisiert, wohingegen Farnesyldiphosphat-Synthase im Cytosol gefunden werden kann [45]. Ein bedeutender Vertreter der IPPS ist die Phytoen-Synthase, welche an der Synthese des ersten C₄₀ Intermediates der Carotinoidbiosynthese beteiligt ist.

1.4.4. Protein-Prenyltransferasen

Protein-Prenyltransferasen tragen eine wichtige Funktion bei der posttranslationalen Modifizierung von Proteinen. Neben der Protein-Farnesyltransferase zählt die Protein-Geranylgeranyltransferase I, und die Protein-Geranylgeranyltransferase II (auch Rab-Geranylgeranyltransferase) zu den wichtigsten, derzeit bekannten Protein-Prenyltransferasen, zu denen auch dreidimensionale Strukturen in der PDB existieren [46;47]. Diese Enzyme transferieren einen Isoprenrest auf ein Protein bzw. auf ein Peptid. Dabei stellen Thiolgruppen von Cysteinen die nucleophilen Spezies dar und im Vergleich zu den „herkömmlichen“ Prenyltransferasen wird keine C-C-Bindung geknüpft, sondern eine C-S-Bindung. Während die Protein-Farnesyltransferase unter Spaltung von Farnesyldiphosphat einen Farnesylrest auf ein C-terminal lokalisiertes Cystein überträgt, katalysieren die Geranylgeranyltransferasen eine Übertragung von Geranylgeranylresten ausgehend von Geranylgeranyldiphosphat. Im speziellen Fall der Geranylgeranyltransferase II erfolgt eine doppelte Prenylierung eines Rab-Proteines. Wie auch das Ras-Protein, gehört das Rab-Protein zur Klasse der G-Proteine, welche über die Bindung und Hydrolyse von GTP aktiviert oder inaktiviert werden. Es ist maßgeblich an Signaltransduktionsprozessen und damit der Zellteilung beteiligt, deren Veränderungen pathobiochemische Auswirkungen haben. Protein-Prenyltransferasen verfügen nicht über ein charakteristisches N/DDxxD-Motiv und die Aktivierung des Oligoprenyldiphosphats wird über Zn²⁺-ionen vermittelt. Dennoch führen hohe Mg²⁺-Konzentrationen zu einer Zunahme der Gesamtaktivität, zumindest die Protein-Farnesyltransferase betreffend. Es wird vermutet, dass Magnesium eine separate Bindungsstelle im Protein besetzt, über welche die Bindung des Diphosphats resultiert [48]. Die Erkennung der Substrate erfolgt über C-terminale CC-, CxC-, CCx-, CCxx-, CCx- oder Cxxx-Sequenzen. Proteine, welche C, M, S, A oder Q als C-terminale Aminosäure aufweisen sind prädestiniert für eine Farnesylierung, wohingegen L eine Geranylgeranylierung zu Folge

hat. Es muss beachtet werden, dass diese Substratspezifität nicht zwingend festgelegt ist, weil verschiedene Proteine sowohl durch Farnesylreste, als auch durch Geranylgeranylreste modifiziert werden [4;49;50].

Die Farnesylierungen bzw. Geranylgeranylierungen ermöglichen direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen ebenso wie die Verankerung der Proteine mit Membranen. Außerdem dienen sie als Ausgangspunkt für weitere Modifikationen und die Lokalisation der Enzyme in der Zelle ist abhängig von der Art der Prenylierung [51]. Das Vorkommen von Protein-Prenyltransferasen beschränkt sich, nach derzeitigem Wissen nur auf Eukaryoten, wenngleich diese dort weit verbreitet sind. Es wird von Protein-Prenyltransferasen in Wirbeltieren, Insekten, Fadenwürmern, Pflanzen, Pilzen, Protozoen und dem menschlichen Organismus berichtet [52].

In Abbildung 8 ist der prinzipielle, formale Mechanismus der posttranslationalen Modifikation von Proteinen anhand der Protein-Farnesyltransferase dargestellt.

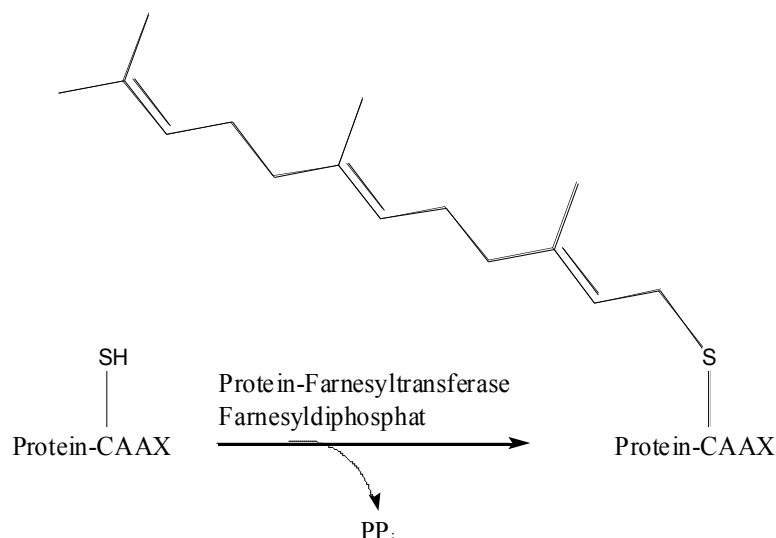


Abbildung 8: Farnesylierung eines Proteins vermittelt durch die Protein-Farnesyltransferase

1.5. Zielstellung der Arbeit

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit existierten keine dreidimensionalen Strukturen zu aromatischen Prenyltransferasen und nur verhältnismäßig wenig detaillierte Informationen über biokatalytische Mechanismen. Das mag daraus resultieren, dass ein Großteil dieser Gruppe prenylierender Enzyme in eine Membran integriert oder zumindest daran assoziiert ist. Eine röntgenkristallographische Aufklärung ist demnach äußerst schwierig.

Mit Hilfe aktueller Methoden des Molecular Modelling war es Ziel, ein Modell der 4-Hydroxybenzoesäure oligoprenyltransferase (ubiA-Enzym) von *E. coli* zu erstellen. Anhand von multiplen Sequenzanalysen (Alignments, etc.) und der entwickelten Struktur sollte das katalytisch aktive Zentrum des Enzyms identifiziert und charakterisiert werden. Automatische, sowie manuelle Dockingexperimente und quantenmechanische Berechnungen sollten zum Verständnis des derzeit bekannten Substratspektrums des zwei-Substrat-Enzyms beitragen. Dadurch wären detaillierte Einblicke in den Katalysemechanismus der *ortho*-phenolischen Prenylierung möglich. Auf Basis des entwickelten Strukturmodells sollten gerichtete Mutationsexperimente durchgeführt werden, um die Aussagekraft des Modells bzw. dessen aktiven Zentrums zu verifizieren. Gegebenenfalls lassen sich zusätzlich Informationen zum evolutiven Ursprung des Enzyms ableiten.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit stellt die Analyse zweier Terpenzyklasen aus *Cannabis sativa* dar. Die einzigen Vorarbeiten bezüglich der beiden Enzyme beschränken sich auf die Klonierung und Sequenzierung der entsprechenden Gene [53]. Mittels Homologie-Modelling sollten Modelle für beide Enzyme entwickelt werden, um eine Vorstellung über deren Tertiärstruktur und aktive Zentren zu erlangen. Daran angeschlossene Dockinganalysen und strukturelle Vergleiche beider Enzyme sollten die Grundlage für Mutationsexperimente darstellen. Die so modifizierten Enzyme müssten sich durch unterschiedliche Aktivitäten oder Produktspezifitäten auszeichnen und auf diese Weise sowohl Einblicke in den Zyklisierungsmechanismus preisgeben, als auch Aussagen über die Qualität der entwickelten Modelle erlauben. Mit Hilfe von QM/MM- und reinen QM-Berechnungen war geplant, die bereits erwähnte Produktspezifität auf atomarer Ebene zu erklären und zu diskutieren. Alle angestrebten Untersuchungen setzen die umfangreiche Anwendung molekularbiologischer-, mikrobiologischer- und chemo/bioinformatischer Techniken und Methoden voraus und sollten zu einem besseren Verständnis prenylierender Enzyme beitragen.

2. Materialien und Methoden

2.1. *in silico* Methoden

2.1.1. Molekülmechanik

Die wohl einfachste Methode Wechselwirkungen zwischen Atomen und Molekülen zu beschreiben, beruht auf Modellen deren Basis empirische Funktionen darstellen. Derartige Verfahren, welche umgangssprachlich auch unter den Begriffen Kraftfeld oder Molekülmechanik zusammengefasst werden, gehen ursprünglich aus einem Ansatz zur Beschreibung von elektromagnetischen Kräften, basierend auf simplifizierten physikalischen Gesetzen (beispielsweise Federkräfte- und Konstanten) hervor. So genannte Molekülmechanische Methoden eignen sich hervorragend zur Beschreibung sehr komplexer Systeme mit vielen Freiheitsgraden. Dabei müssen zwei Grundbedingungen erfüllt sein: Moleküle sind aus Atomen mit definierten Bindungen aufgebaut und sowohl die Atome, als auch die Bindungen müssen entsprechend parametrisiert sein. Die Berechnung von chemischen Reaktionen, welche Bindungsspaltungen oder Neubildungen erfordern, ist mit molekülmechanischen Methoden im Allgemeinen nicht möglich. Wechselwirkungen zwischen gebundenen oder nicht gebundenen Atomen werden über speziell definierte Parameter, welche meist experimentellen Ursprungs sind, in die Berechnungen integriert. Ausgehend von diesen Werten sind "natürliche" Längen und Winkel definiert, deren Veränderung zu Spannungen im System führt. Die Optimierung der Geometrie folgt dem Ziel, die lokalen Spannungen abzubauen und die Summe der einzelnen Energieterme zu minimieren. MM2 sowie MM3 und MM4 von Allinger gelten auch heute noch als populäre Kraftfelder [54]. Sie beinhalten neben den üblichen Energietermen, welche im Folgenden kurz beschrieben werden, beispielsweise die Möglichkeit zur Berechnung konjugierter π -Systeme.

$$V = V_{ST} + V_B + V_T + V_{vdW} + V_{ST/B} + V_{ST/T} + V_m;$$

Die Terme V_{ST} bis V_T sollen die Deformation der Bindungslängen (V_{ST}) und der Bindungswinkel (V_B), sowie das Torsionspotential (V_T) beschreiben. Die dispersiven Kräfte sind im Term V_{vdW} und die weit reichenden elektrostatischen Wechselwirkungen im Term V_m zusammengefasst. Daneben bezeichnen die Kreuzterme $V_{ST/B}$, $V_{ST/T}$ die

Wechselwirkungen zwischen Bindungslänge und Bindungs- bzw. Torsionswinkel, welche nach Art und Komplexität des Kraftfelds variabel sind. Durch die Wahl der Parameter und Potentiale kann das Kraftfeld individuell angepasst werden, beispielsweise zur Berechnung von Wechselwirkungsenergien. Innerhalb kurzer Zeit wurden eine Vielzahl von Kraftfeldern für ganz bestimmte Aufgabenstellungen entwickelt. In der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem mit den Kraftfeldern GROMACS, CHARMM, TRIPOS, MMFF, OPLS2001 und AMBER gearbeitet [55-60]. Für die bearbeitete Problematik lieferten insbesondere AMBER, CHARMM und das Tripos-Kraftfeld die zuverlässigsten Ergebnisse.

2.1.2. Quantenmechanik

Kraftfeldmethoden sind für eine Vielzahl von Fragestellungen besonders gut geeignet, doch durch die Beschränkung auf Grundzustände mit fest definierten Bindungen stoßen molekülmechanische Methoden an ihre Grenzen. Zur Berechnung von Übergangszuständen, angeregten Geometrien oder Elektronen-Transfer-Prozessen muss deshalb auf quantenmechanische Verfahren zurückgegriffen werden, deren Kapazität aber auf eine viel kleinere Anzahl von kalkulierbaren Atomen beschränkt ist.

Zur exakten Beschreibung eines Moleküls, ist die Kenntnis über die Verteilung aller Elektronen und aller Atomkerne zu jedem Zeitpunkt erforderlich, wobei für Elektronen allerdings nur statistische Aussagen über den Aufenthaltsort und den Impuls möglich sind. Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit wird über das Quadrat der Wellenfunktion Ψ berechnet, welche sich direkt aus der Schrödingergleichung ableitet. Auch die quantenchemischen Verfahren beruhen auf einer Minimierung der Energie des Gesamtsystems und damit der Gesamtwellenfunktion. Mathematisch können die nichtlinearen Gleichungssysteme der Schrödingergleichung über Näherungen gelöst werden, zu denen z.B. die in dieser Arbeit verwendete Hartree-Fock-Approximation gehört. Diese Methode ist in den Programmen GAUSSIAN, Jaguar oder Qsite (Schroedinger inc.) implementiert.

Da *ab initio* Berechnungen selbst auf extrem leistungsstarken Computersystemen viel Zeit in Anspruch nehmen, wird häufig auf semiempirische quantenmechanische Verfahren zurückgegriffen. Dabei werden nicht alle Integrale der Schrödingergleichung berechnet, sondern zum Teil an experimentelle Werte approximiert. Weiterhin gehen lediglich die Außenelektronen im betrachteten Molekül in die Kalkulation ein. Es existieren zahlreiche semiempirische quantenmechanische Verfahren, unter ihnen das hier verwendete PM3 [61].

Diesen quantenmechanischen Methoden gemein ist, dass eine Berechnung der Systeme nur in der Gasphase möglich ist.

Will man biochemische katalytische Prozesse betrachten, welche enorm von Effekten, wie Proteinumgebung etc. abhängen, ist es zweckmäßig molekülmechanische und quantenmechanische Methoden miteinander zu kombinieren. Dabei wird ein relativ kleiner Teil des Systems, üblicherweise das aktive Zentrum eines Proteins inklusive der reagierenden Spezies, quantenmechanisch berechnet. Der übrige Teil hingegen geht über ein ausgewähltes Kraftfeld in die Kalkulation ein, muss aber eng mit dem quantenmechanischen Teil interagieren. Das ist nötig, um beispielsweise Polarisierungseffekte aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen aus dem Kraftfeldteil in die quantenmechanische Berechnung einzubeziehen. Programmpakete, wie das hier verwendete Qsite erlauben eine handhabbare Energieminimierung solcher Problemstellungen, sind aber durch deren vorgegebene Kraftfelder und Programmierfehler im Funktionsumfang eingeschränkt. Einen informativen und umfangreichen Einblick in QM/MM-Problemstellungen bietet der Übersichtsartikel „Modelling enzyme reaction mechanisms, specificity and catalysis“ [62].

2.1.3. Die „Protein Data Bank“

Die wohl wichtigste und mit momentan ~36.000 dreidimensionalen Strukturen auch größte Datenbank für Proteine und Nucleinsäuren ist die Brookhaven Protein Data Bank^(a) [63]. Diese enthält neben zahlreichen Röntgenkristallstrukturen auch NMR-Strukturen und Computermodelle, welche mit einem speziellen vier-Buchstaben-Code gespeichert und öffentlich zugänglich sind.

Viele proteinbiochemische und theoretische Vorhaben setzen die Nutzung der so genannten PDB voraus, sei es bei der Erstellung von Pharmakophormodellen, der Entwicklung von Inhibitoren oder Generierung von Homologie Modellen. Damit ist die Protein Data Bank, die bereits 1972 installiert wurde und seitdem einem exponentiellen Wachstum unterliegt, zu einem unverzichtbaren Werkzeug für Biochemiker, Biologen und Kristallographen geworden.

(a) – (www.rcsb.org/pdb)

2.1.4. Biologische Datenbanken

Die größten primären biologischen Datenbanken und damit die erste Anlaufstelle für „Sequenzsuchen“ sind die Genbank^(b), EMBL^(c) und DDBJ^(d). Sie beinhalten einen immensen Informationsgehalt, erschweren aber durch die Redundanz ihres Inhaltes die Suche. Aus diesem Grund etablierten sich redaktionell geführte System, wie beispielsweise die in dieser Arbeit benutzten SWISSPROT- und BRENDA-Datenbanken, welche darüber hinaus eine Suche nach Zusatzinformationen (Domänen, Proteinfamilien, etc.) zur Verfügung stellen [64;65]. Allen Datenbanken gemein ist der plattformunabhängige Zugriff über das Internet und die Aktualität der Inhalte.

2.1.5. Strukturvorhersagen

Ein wesentliches Problem bei der Untersuchung der Proteinfaltung stellt das Erlangen von Strukturinformationen der betrachteten Proteine dar. Existieren keine Röntgenkristallstrukturen, ist es mit Hilfe verschiedener Methoden möglich die Sekundärstruktur einer beliebigen Aminosäuresequenz vorherzusagen. Man unterteilt prinzipiell in statistische-, physikochemische und hybride Sekundärstrukturvorhersagemethoden, welche ihren Ursprung in den Arbeiten von Chou, Fasman, Garnier, Ogusthorpe und Robson hatten [66;67]. Mittlerweile haben selbstlernende Systeme oder neuronale Netzwerke, welche eine Vorhersagezuverlässigkeit von über 75% gewährleisten, die „älteren“ Methoden nahezu abgelöst [68]. Die in dieser Arbeit am häufigsten benutzten Sekundärstrukturvorhersagen sind 3d-pssm^(e) und phd-predict protein^(f) [69;70]. Ein weiterer wichtiger Gesichtspunkt bei der Erlangung von Strukturinformationen ist die Vorhersage von Motiven, beispielsweise Transmembranhelices, welche gleichzeitig Schlussfolgerungen über zelluläre Lokalisation von Proteinen mit einer Genauigkeit oberhalb 80% erlauben. Ein hilfreiches Werkzeug bei der Zuordnung und Charakterisierung von Proteinsequenzen stellte TMHMM^(g) dar [71].

(b) - (www.ncbi.nlm.nih.gov); (c) - (www.ebi.ac.uk); (d) - (www.ddbj.nig.ac.jp)

(e) - (www.sbg.bio.ic.ac.uk/~3dpssm); (f) - (cubic.bioc.columbia.edu/predictprotein);

(g) - (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0>)

2.1.6. Alignments und multiple Alignments

Sequenzalignments dienen dem Vergleich zweier oder mehrerer Strings (Sequenzpositionen) und stellen damit die fundamentalste Methode in der Bioinformatik und der molekularen Phylogenie dar. Hintergrund ist die Analyse funktioneller oder evolutionärer Verwandtschaften von DNA- oder Proteinsequenzen. Das einfachste Alignment besteht aus zwei Sequenzen, welche aufgrund der Position ihrer Nukleotide bzw. Aminosäuren aneinander ausgerichtet werden können. Bei Proteinsequenzen entscheidet eine Substitutionsmatrix über das Ausmaß der Ähnlichkeit der Positionen. Die Entwicklung derartiger Matrizen geht auf Arbeiten von M. Dayhoff und S. Henikoff zurück [72;73]. Die Wahl der Substitutionsmatrix hängt direkt von der untersuchten Problematik und der Similarität der zu vergleichenden Sequenzen ab.

Um ein biologisch bzw. evolutionär konserviertes Motiv identifizieren zu können, aus welchem sich tatsächlich Gemeinsamkeiten und Unterschiede in Struktur und Funktion ableiten lassen, ist es nötig, mehrere Sequenzen miteinander zu vergleichen. Dazu wird ausgehend von paarweisen Alignments aller zu untersuchenden Sequenzen ein „phylogenetischer Baum“ abgeleitet. Entlang dieses Baumes kann schließlich progressiv nach einem vorgegebenen Algorithmus ein multiples Alignment bestimmt werden. Bekannte Algorithmen werden über Multalin^(h) oder BLAST⁽ⁱ⁾ zur Verfügung gestellt [74;75]. Für Sequenzalignments wurden ausschließlich die Matrizen BLOSUM30, 35, 45 und 50 verwendet.

2.1.7. Modellierung und Evaluierung

Das Programmpaket MOE nutzt eine Datenbankgestützte Methode, um Modelle für Proteinsequenzen zu entwickeln. Als Modellierungsvorlage (in der weiteren Arbeit, wie umgangssprachlich als „Template“ bezeichnet) wird die Struktur eines Proteins verwendet, welches eine höchstmögliche Identität bzw. Ähnlichkeit zum Zielprotein aufweist. Mit kurzen Stichpunkten lässt sich die Modellierung folgendermaßen zusammenfassen:

(h) – (prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html); (i) – (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)

- Initiierung einer partiellen Startgeometrie des Zielproteins durch kopieren der Koordinaten von selektierten oder konservierten Sequenzbereichen der Template-Bereiche
- Boltzman-Zufalls-Prozedur [76] zur Handhabung von Insertionen oder Deletionen; Generierung von „Übergangsmodellen“ unter Berücksichtigung von Peptidrückgrat, Seitenketten und potentiellen Wasserstoffbrückenbindungen
- Berechnung der Koordinaten des resultierenden Modells, Energieminimierung (vom Kraftfeld abhängig); Speicherung

Der empfindlichste Schritt bei dieser Prozedur ist die Generierung der Insertionen und Deletionen, da für diese keinerlei Informationen (Koordinaten) aus der Template-Struktur vorliegen.

Die erzeugten Modelle müssen hinsichtlich ihrer Energie minimiert (siehe MM) werden und bestimmte Anforderungen an geometrische Restriktionen erfüllen. So dürfen die Moleküle beispielsweise keine unzulässigen Bindungslängen, Bindungswinkel, Torsionswinkel oder gar sterische Behinderungen zwischen benachbarten Atomen aufweisen. Mit dem Programm Procheck kann unter anderem ein so genannter Ramachandran-Plot erzeugt werden, auf welchem die Torsionswinkel Φ und Ψ des Peptids gegeneinander aufgetragen sind [77]. Mit diesem lässt sich leicht abschätzen, ob beispielsweise Diederwinkel von Aminosäuren sterisch unerlaubte Werte annehmen und einer eventuellen Korrektur bedürfen.

Die meisten Proteine sind durch ihre native Faltung charakterisiert und ihr physiologischer Endzustand kann als Funktion der Aminosäuresequenz angenommen werden. Die ersten umfassenden Theorien zur Proteinfaltung wurden durch C. Anfinsen postuliert und 1972 mit dem Nobelpreis für Chemie honoriert [78]. ProsaII ist ein aussagekräftiges Programm zur Analyse von Proteinen bzw. deren Faltungszustand [79]. Hauptkomponente der Software ist die Zusammenstellung von spezifischen Funktionen und Potentialen der „mittleren Kraft“ von C- α -, C- β -Atomen und der Proteinoberfläche, welche eine direkte Abschätzung der Proteinfaltung erlauben. In der Konzeption von ProsaII ist die Berechnung der Oberflächenpotentiale für membrangebundene Proteine nicht berücksichtigt.

Verschiedene Liganden binden mehr oder weniger stark im aktiven Zentrum eines Proteins oder assoziieren an dessen Oberfläche. Eine Möglichkeit derartige Bindungsaffinitäten theoretisch zu bestimmen bietet die Software Score [80]. Das Programm nutzt dazu empirische Funktionen, welche Einzelterme für van der Waals Kontakte, Wasserstoffbrücken-Bindungen, Desolvatationseffekte und Metal-Ligand Bindungen beinhalten. Die Koeffizienten jedes Terms resultieren aus multivarianten Analysen von 170 Protein-Ligand-Strukturen aus der Protein Data Bank.

2.1.8. Software und Programmpakete

Die Anzahl der Programme und Routinen, welche eine Modifikation und Analyse von Proteinen oder Molekülen erlauben ist immens. Im Folgenden werden die wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Anwendungen zusammenfassend und ohne Wertung aufgeführt:

Anwendung	Herkunft
Gaussian Programmpaket QM; QM/MM	Gaussian, Inc. 340 Quinnipiac St Bldg 40 Wallingford, CT 06492 USA
GOLD - Genetic Optimization Ligand Docking Voraussage von Ligand-Protein-Bindungsverhalten	Cambridge Crystallographic Data Centre, 12 Union Road Cambridge, UK
MOE – Molecular Operating Environment Molecular Modelling Programmpakt	Chemical Computing Group Suite 910 - 1010 Sherbrooke St. W Montreal, Quebec, Canada H3A 2R7
Procheck Protein-Struktur und Geometrie Evaluierung	European Bioinformatics Institute, Hinxton, Cambridge, CB10 1SD, United Kingdom
Prosa II - PROtein Structure Analysis Proteins-Faltungs-Analyse	Center Of Applied Molecular Engineering, Jakob-Haringer Str. 1, A-5020 Salzburg / AUSTRIA
Qsite Programm QM/MM; QM; MM	Schroedinger TM , 120 West 45th Street, 29th Floor New York

Spartan Programm QM; semiempirische QM	Wavefunction, Inc. 18401 Von Karman Avenue, Suite 370, Irvine, CA 92612 USA
SYBYL Molecular Modelling Programmpaket	Tripos, Inc. 1699 South Hanley Road St. Louis, MO 63144-2319 USA
Insight II Molecular Modelling Programmpaket	Accelrys Ltd. 334 Cambridge Science Park Cambridge, CB4 0WN

2.1.9. Computersystem der Arbeitsgruppe Computerchemie

Stereo-Grafikworkstations

- 3 SGI Octane (400 MHz R12000 CPU; 2,8 bzw. 1,0 GByte RAM; IRIX)
- 1 SGI Fuel (500 MHz R14000 CPU; 1 GByte RAM; IRIX)
- 3 PC-Workstations (3,2 GHz AMD64 CPU; 2 GByte RAM; Linux)

Linux-Computercluster

- 1x Quad-Opteron (Opteron 875 Dualcore-CPU; 16 GByte RAM)
- 7x Dual-Xeon (2,66 GHz Xeon-HT; 2 GByte RAM)
- 1x WebApplication- & Boot-Server (2,66 GHz Xeon-HT; 2 GByte RAM)
- 1x Fileserver (2,2 GHz Xeon; 1 GByte RAM; externes 2,4 TByte RAID-Subsystem)
- 6x Pentium-Computeserver (2,0 GHz Pentium IV, 1 GByte RAM), davon 2 für spezielle Anwendungen mit Windows 2000 anstelle von Linux

2.2. *in vivo* / *in vitro* Methoden

2.2.1. Bakterienstämme

Für Klonierungen und Expressionen wurden die folgenden *E. coli* Bakterienstämme benutzt:

DH10B (Invitrogen):

F⁻, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), φ80lacZ, ΔM15, ΔlacX74, recA1, endA1, araΔ139, Δ(ara, leu)7697, galU, galK, λ⁻, rpsL, (Str^R) nupG

TOP10 (Invitrogen):

F⁻, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC), ΔlacX74, Φ80lacZΔM15, deoR, recA1, endA1, galK, nupG, araD139, Δ(ara-leu)7697, rpsL, (Str^R), galU

BL21(DE3)RIL (Stratagene):

F – ompT hsdS (r B⁻ mB⁻)dcm⁺Tet r gal. (DE3)endA Hte [argU ileY leuW Cam r]

2.2.2. Plasmide

pET101/D-TOPO (Invitrogen):

Der Vektor ist 5,7 kb groß und besitzt eine TOPO Klonierungsstelle (Topoisomerase) mit 5' „sticky-end“ (GTGG antisense) und 3' „blunt-end“. Die Ligation erfolgt somit gerichtet. Weitere Spezifikationen sind ein T7 Promotor und eine Transkriptions-Terminations-Stelle sowie eine T7r-Primer Stelle, ein lac-Operator (lacO), ein V5-Epitop, ein C-terminales 6x His-tag, ein pBR322 Replikationsursprung und eine Ampicillin Resistenz.

pALMU3 [33]:

Für das ubiA-Enzym wurde der 4,9 kB große pALMU3-Vektor als Expressionssystem verwendet, welcher aus dem pTZ19R System von Pharmacia resultiert und sowohl multi-cloning-site als auch eine Ampicillin-Resistenz trägt.

2.2.3. Biologische Präparate

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien waren von analytischem Reinheitsgrad. Alle nicht in Tabelle 1 aufgeführten Materialien sind Standardchemikalien und wurden von Sigma, Merck oder Roth bezogen.

Tabelle 1: Zusammenstellung der in der Arbeit verwendeten Chemikalien, Enzyme und Materialien

Material	Herkunft
FactorXa	Amersham Bioscience
Bacto-Tryptone, Bacto-Agar, Hefe Extract	BD Otto Nordwald
Anti-Rabbit IgG Peroxidase Conjugate	BIORAD
SeaKem LE Agarose	Cambrex Bio Science
diverse Aminosäuren	Fluka
Trizol [®] Reagent, AccuPrime [™] Pfx SuperMix	Invitrogen
Taq-Polymerase, Pfu-Polymerase, dNTP's, Protein-Molekulargewichtsstandards	MBI Fermentas
Oligonukleotide (siehe 2.2.4.)	MWG
Anti-Mouse IgG Alkalische Phosphatase Conjugate	Promega
diverse QIAquick [®] Kits	QIAGEN
Rotisol [®] Methanol	Roth
Anti-Mouse IgG Peroxidase Conjugate, Kodak BioMax MS Film, Oligonukleotide, Antibiotika	Sigma

2.2.4. Oligonukleotide

Es wurden folgende Vektorprimer und Mutationsprimer verwendet. Weiterhin fanden zahlreiche Primervariationen Verwendung, welche hier aber nicht aufgeführt werden sollen.

Tabelle 2: Primer ubiA

Mutation	5' Primer	3' Primer (revers komplementär)
D71A	AS1_mut1_1 GATTATGCTGCGCGCAAGTTTGATGG	AS1_mut1_2 CTTGCGCGCAGCATAATCATTACC
D75A	AS1_mut2_1 CGCAAGTTTGCGGGTCATGTTAAGCG	AS1_mut2_2 AACATGACCCGCAAACCTGCGGTCAGC
R137A	AS1_mut3_1 TTTATGAAGGCGTATACCCATCTACC	AS1_mut3_2 GATGGGTATACGCCTTCATAAACGG
D191A	AS2_mut1_1 GCGATGGTTGCGCGCATGATGATG	AS2_mut1_2 CACATCATCATCGCGCGCAACCATCGC
D195A	As2_mut2_1 CGCGATGATGCGGTGAAGATTGGC	AS2_mut2_2 CTTCACCGCATCATCGCGGTCAACCATGC
ubiA-6xHis (C-terminal)	5'Topo_UbiA CACCATGGAGTGGAGTCTGA	3'Topo_UbiA_His_1 TCAATGATGATGATGATGATGGAAATGCCAG TAACTCATTGC
ubiA-6xHis (C-terminal)	5'Topo_UbiA_2 CACCATGGAGTGGAGTCTGACGCAGAA	3'Topo_UbiA_His_2 TCAATGATGATGATGATGATGGAAATGCCAG TAACT
ubiCA-6xHis (C-terminal)	Topo_ubiCA_5' CACCATGTCACACCCCGCTTAACG	3'Topo_UbiA_His_1 TCAATGATGATGATGATGATGGAAATGCCAG TAACTCATTGC

Tabelle 3: Primer CsTps

Mutation	5' Primer	3' Primer
C343A	cstps1_2_blunt GATAGATTGGTGGAGGCGTTCTTATG GCAAGTTGGAGTAA	cstps1_2_blunt TTACTCCAACCTGCCATAAGAACGCCTCCAC CAATCTATC
C343S	cstps1_bs1_blunt GATAGATTGGTGGAGAGCTTCTTATG GCAAGTTGGAGTAA	cstps1_bs1_blunt TTACTCCAACCTGCCATAAGAAGCTCTCCAC CAATCTATC
H602F	cstps1_bs2 GTATGGCGATGGATTTGCTTCT	cstps1_bs2 TATTCTGAGAAGCAAATCCATC
Y367I	cstps1_1bs3 GATACAAAACCTCATAGTTCTATTA	cstps1_1bs3 TAATAGAACTATGAGTTTTGTATC
Vektorprimer (EcoRI-Age)	cstps1_Eco (a) GAATTGTGAGCGGATAACAATTCC	cstps1_age (a) TTATGCTAGTTATTGCTCA
Vektorprimer (EcoRI-Age) 2	cstps1_Eco (b) GCGTAGAGGATCGAGATCTCGATCC	cstps1_age (b) TAGTTATTGCTCAGCGGT

2.2.5. Elektrophoresen

Als Elektrophorese wird prinzipiell die Bewegung elektrisch geladener Teilchen, vermittelt durch ein Trägermaterial, im elektrischen Feld bezeichnet. Dabei ist die Wanderungsgeschwindigkeit v proportional zur Feldstärke E und der Ionenladung Q und umgekehrt proportional dem Teilchenradius r und der Viskosität η des Stoffes. Die Elektrophorese zählt zu den analytischen Standardmethoden in der Chemie, Biologie und Biochemie.

Eine bedeutende Unterart stellt die Gelelektrophorese dar, wobei eine spezielle Gelmatrix das Trägermaterial darstellt und durch eine entsprechende Versuchsanordnung eine Auftrennung der Moleküle nach ihrer Größe erreicht werden kann. Die Bestandteile des Gels, beispielsweise Agarose oder Polyacrylamid, bilden ein engmaschiges Netzwerk, welches je nach Vernetzungsgrad die Wanderungsgeschwindigkeit der zu trennenden Moleküle im elektrischen Feld beeinflusst. Abhängig von der Anwendung werden dem Gel entsprechende Zusätze beigemischt, wie zum Beispiel SDS (Natriumdodecylsulfat), durch welches die Ladungsunterschiede der Ionen ausgeglichen werden und eine Auftrennung quasi nur noch nach der Größe des Moleküls erfolgt. Die Elektrophorese wird im Idealfall beendet, wenn die kleinsten oder mobilsten Moleküle bzw. die Laufmittelfront das Ende des Gels erreicht haben oder eine ausreichend gute Trennung erfolgt ist.

Zur Auswertung des Gels nutzt man verschiedene Eigenschaften der aufgetrennten Moleküle, beispielsweise die Interkalation von Ethidiumbromid mit DNA, welche dann durch UV-Strahlung zur Fluoreszenz angeregt und auf dem Gel lokalisiert werden kann. Proteine können durch anfärben (Coomassie, Silber) oder immunologisch nachgewiesen werden (Western-Blot). Gleiche Moleküle laufen in diskreten Zonen, welche umgangssprachlich als Banden bezeichnet werden, durch das Gel und können mit bekannten Standards verglichen und ausgewertet werden. Die Bestimmung der Menge einer Substanz in der Bande beziehungsweise deren relativer Anteil nach einer Färbung des Gels ist mittels einer densitometrischen Auswertung möglich.

2.2.5.1. DNA-Gele (Agarose)

Die Agarosegel Elektrophorese wurde zur Trennung und Identifizierung von DNA-Fragmenten der Länge 0,5-10 kb mit folgenden Puffersystemen verwendet.

50x TAE:

242 g Tris-Base; 57,1 ml Essigsäure; 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0; ad 1000 ml H₂O

5x Probenpuffer:

Saccharose (40% w/v); Orange G (0,001% w/v)

10% Agarose wurde in 1x TAE-Puffer erhitzt, mit Ethidiumbromid (0,4 µg/ml) versetzt und nach kurzer Abkühlphase in die Gelkammer gegossen. Die Proben wurden mit 5x Probenpuffer auf das Gel geladen und bei ~100 V aufgetrennt. Die Identifizierung der Größe erfolgte unter UV-Licht mit einem Längenstandard welcher ebenfalls aufgetragen wurde.

2.2.5.2. Protein-Gele (SDS)

Zur Überprüfung und Zuordnung von Proteinexpressionen wurden sowohl denaturierende (Laemmli, 1970), als auch native (ohne SDS und Hitzedenaturierung) SDS-Polyacrylamid-Gele verwendet. Dazu versetzt man Expressionspellets, und Aliquots der Rohextrakte bzw. Eluat nach der Aufreinigung mit 1x SDS-PAGE Probenpuffer, invertiert, denaturiert bei 95 °C für 5 min und kühlt auf Eis kurz ab. Genomische DNA, welche oftmals noch in Pelletproben enthalten ist und das Auftragen auf das Gel erschwert, kann durch einen kurzen Ultraschallpuls auf Eis (oder durch Desoxyribonuclease) zerstört werden. Es wurden ca. 10-20 µl des Überstandes auf 10 oder 12%ige Gele aufgetragen und bis zum Verlassen des Sammelgels bei 15 mA, danach bei 20 mA aufgetrennt. Zusätzlich aufgetragene Standards erlauben eine Zuordnung des gesuchten Proteins nach dessen Größe. Zum Färben der Gele wurden diese für ca. 15 min im Färbebad auf einem Plattformschüttler geschwenkt, und anschließend bis zum gewünschten Resultat mit Entfärbelösung versetzt. Es wurden Puffer und Lösungen mit den folgenden Zusammensetzungen verwendet:

SDS-Trenngel (5 ml, 12%):

1,6 ml H₂O; 2,0 ml Rotiporese Acrylamid Mix (30%); 1,3 ml 1,5 M Tris (pH 8,8);
0,05 ml SDS (10%); 0,1 ml Ammoniumpersulfat (10%); 0,004 ml TEMED

SDS-Trenngel (5 ml, 10%):

1,9 ml H₂O; 1,7 ml Rotiporese Acrylamid Mix (30%); 1,3 ml 1,5 M Tris (pH 8,8);
0,05 ml SDS (10%); 0,1 ml Ammoniumpersulfat (10%); 0,004 ml TEMED

SDS-Sammelgel (2 ml; 5%):

1,4 ml H₂O; 0,33 ml Rotiporese Acrylamid Mix (30%); 0,25 ml 1,0 M Tris (pH 6,8);
0,02 ml SDS (10%); 0,06 ml Ammoniumpersulfat (10%); 0,004 ml TEMED

2.2.6. Nukleinsäureisolierung und -präparation

Die Identifizierung und Analyse von Plasmid-DNA sowie die Evaluierung von Ligationen oder Restriktionsverdauen macht eine Isolation von DNA aus den entsprechenden Mikroorganismen unabdingbar. Wird danach noch eine weitere Aufarbeitung oder sogar eine Sequenzierung angestrebt, ist es unbedingt erforderlich die DNA von störenden Salzen, unerwünschten Oligonukleotiden, Primern oder überschüssigen dNTP's zu befreien.

Das Prinzip der Aufreinigung von DNA nach Qiagen-Protokoll ist denkbar einfach. Spezielle QIAprep Säulen enthalten ein bestimmtes Silica Gel, welches bis zu 200 µg DNA binden kann, ungeachtet der Präsenz von chaotropen Salzen. Darauf folgende Waschschrte erlauben letztendlich ein Einengen und Eluieren der gereinigten DNA in Wasser oder geeignetem Puffer mit einer geringen Salzkonzentration.

2.2.6.1. DNA Minipräparation

Zur Isolation und Präparation von Plasmiden bzw. DNA aus Bakterienzellkulturen wurde die DNA Minipräparation (Qiagen) verwendet. Hierzu wurden 3-6 ml LB Medium mit entsprechender Antibiotika-Selektion entweder mit einer Glycerinkultur oder mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und ca. 130 rpm geschüttelt. Nach der

Inkubation erfolgte eine Zentrifugation der Kultur bei 13.000 rpm. Das Bakterienpellet wurde dem Zellaufschluss und der anschließenden Reinigung der Plasmide mit Hilfe des QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) nach dem Protokoll für Microzentrifugen zugeführt.

2.2.6.2. DNA Extraktion über ein Agarosegel

Die Isolation von DNA-Fragmenten nach Restriktionsverdauen, Ligationen oder PCR wurde mit Hilfe eines präparativen Agarosegels durchgeführt, welches das Auftragen von ca. 50 µl Volumen pro Tasche ermöglichte. Nach dem elektrophoretischen Auftrennen der Fragmente wurden diese unter UV-Licht ausgeschnitten und mittels Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt und die DNA entsprechend angereichert.

2.2.6.3. Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR Produkten oder Ligationsansätzen diente lediglich dem Entfernen von dNTP's und Salzen, welche beispielsweise einen störenden Einfluss auf Sequenzierungsreaktionen haben. Die Durchführung erfolgte auch hier gemäß des QIAquick PCR Purification Kit Protokolls (Qiagen).

2.2.7. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Schon zu Beginn der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts gelang dem Nobelpreisträger Har Gobind Khorana die erste künstliche Synthese eines DNA-Fragmentes [81]. Damit legte er den Grundstein für darauf folgende wesentliche Arbeiten zur Entschlüsselung des genetischen Codes [82]. Erst etwa 13 Jahre später wurde die so genannte Polymerase Ketten Reaktion (engl. Polymerase Chain Reaction) erneut durch Kary B. Mullis erfunden, welcher dafür ebenfalls mit einem Nobelpreis geehrt wurde [83]. Seine Idee war die Entwicklung eines Verfahrens, welches es erlaubt in mehreren Zyklen mittels einer Polymerase DNA künstlich zu vervielfältigen. Grundvoraussetzung für diese Reaktion ist das Vorhandensein von DNA-Einzelsträngen, welche durch Hitze (96 °C Denaturierung) aus Doppelsträngen gebildet werden können. Durch die Entdeckung von thermophilen Bakterien und das Wissen über die ubiquitäre DNA-Polymerase gelang es schließlich ein System zu entwickeln, welches eine

extrem beschleunigte und automatisierte Vervielfältigung von DNA *in vitro* erlaubt. Der grundlegende Ablauf einer PCR besteht aus 3 Schritten, welche in 30-50 Zyklen wiederholt werden. In einem PCR-Thermocycler wird doppelsträngige DNA auf 96 °C erhitzt um die beiden Stränge voneinander zu trennen. Nach deren Aufspaltung wird die Temperatur des Systems auf etwa 2-5 °C unterhalb der Schmelztemperatur der Primer reduziert, welche dann mit dem komplementären Abschnitt auf der DNA hybridisieren (primer annealing). Letztendlich füllt die DNA-Polymerase, beginnend am angelagerten Primer die fehlenden Stränge mit freien Nukleotiden (dNTP's) auf und führt so zu einer Elongation oder Verlängerung des entsprechenden DNA-Fragmentes. Ob zur Erstellung genetischer Fingerabdrücke, in der Erforschung von Erbkrankheiten oder eben zur gezielten Mutagenese, die Anwendungsgebiete der PCR sind genauso zahlreich wie ihre möglichen Unterarten. In der hier vorliegenden Arbeit wurden die thermostabilen DNA-Polymerasen *Taq* (*Thermus aquaticus*), *Pfu* (*Pyrococcus furiosus*) und *Pfx* (*Thermococcus spec.*) in Kombination mit verschiedenen PCR-Varianten verwendet. Die wichtigsten sind hier genannt.

Allgemeiner PCR-Zyklus:

Schritt	Temperatur	Zeiten
Denaturierung	96 °C	5 min
20-35 Zyklen		
Denaturierung	96 °C	30-60 s
Annealing	50-65 °C	30-90 s (Primerabhängig)
Elongation	72 °C	1-5 min
Abschlusselongation	72 °C	5-7 min
Reaktionstop	4 °C (oder 20 °C)	∞

Allgemeiner PCR-Reaktionsansatz:

Inhalt	Mengen / Konzentrationen
10x Polymerase-Puffer	2 µl
dNTP's	0,2 mM
5' und 3' Primer	0,2 µM
DNA	100-200 ng oder weniger (Plasmid-DNA)
DNA-Polymerase	2,5 U
H ₂ O	ad 20 µl

 Accuprime Pfx-SuperMix Zyklus:

Schritt	Temperatur	Zeiten
Denaturierung	95 °C	5 min
20 Zyklen		
Denaturierung	95 °C	15 s
Annealing	55 °C	30 s
Elongation	68 °C	6,5 min (min. 1 min/kb)
Reaktionstop	4 °C	∞

Accuprime Pfx-SuperMix Reaktionsansatz:

Inhalt	Mengen / Konzentrationen
Accuprime Supermix	45 µl
5' und 3' Primer	0,2 µM
DNA	100-200 ng oder weniger (Plasmid-DNA)

2.2.8. Klonierungen

Unter dem Begriff Klonierung versteht man in der Molekularbiologie allgemein die Übertragung (Transformation) einer beliebigen DNA-Sequenz in einen entsprechenden Vektor. Typische Vektoren stammen ursprünglich von bakteriellen Plasmiden ab und dienen bei der Klonierung als Transportsystem zur Übertragung der Fremd-DNA. Nach der erfolgreichen Integration der zu untersuchenden Sequenz wird der Vektor in einen Wirt transformiert. Typischer Weise verwendet man dazu *E. coli*, aber auch Hefen oder sogar Eukaryonten eignen sich als Empfängerzellen. Das eigentliche Ziel der Klonierung ist die Amplifikation der zu untersuchenden DNA um diese näher untersuchen zu können, oder das entsprechend kodierte Protein rekombinant zu exprimieren.

2.2.8.1. Ligation in TOPO-Vektoren

Die Ligation des PCR-Produktes in einen TOPO-Vektor erfolgte nach dem Protokoll für TOPO-Vektoren (Invitrogen). Der allgemeine Reaktionsansatz ist im Folgenden wiedergegeben:

PCR-Produkt 10 ng; 1,2 M NaCl 1 µl; 60 mM MgCl₂ 1 µl; pET101/D-TOPO 1 µl;
ad 6 µl H₂O - 30 min bei RT inkubieren und dann auf Eis abkühlen.

2.2.8.2. Hitzeschock-Transformation

100 µl Hitzeschock-kompetente Zellen wurden auf Eis langsam aufgetaut und mit 2 µl Plasmid oder Ligationsansatz nach kurzem Durchmischen für 30 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 45 s in einem 42 °C Wasserbad geschwenkt und danach 2 min auf Eis abgekühlt. Eine rasche Zugabe ad 1 ml LB-Medium und eine darauf folgende Inkubation bei 37 °C (ca. 200 rpm schütteln) für 1-2 h gewährleisten eine maximale Transformationsrate. Nach dem Einengen (Zentrifugation 3000 rpm, 2 min) können die Wirtszellen auf LB-Agar-Platten unter entsprechender Antibiotika-Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert werden.

2.2.9. Verdau mit Restriktionsenzymen

Mit Hilfe spezifischer Restriktionsendonukleasen kann doppelsträngige DNA an palindromartigen Sequenzen oder Erkennungsregionen geschnitten werden. Mit dieser Technik wurden DNA-Fragmente gewonnen, um sie in andere Vektorsysteme zu klonieren. Als Restriktionsendonukleasen wurden *sma*, *sac*, *EcoRI*, *pstI* und *BamHI* verwendet. Es wurden sowohl Doppelverdaue, als auch partielle Verdaue durchgeführt.

Allgemeiner Restriktionsansatz:

DNA 1-2 µg; Restriktionsenzym 10 U; 10x Puffer 1 µl;
ad 10 µl H₂O

Der Restriktionsverdau wurde 1-2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte das entsprechende DNA-Fragment auf einem präparativen Agarosegel mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits (Qiagen) aufgereinigt und weiterverwendet werden.

2.2.10. DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung dient der Verifizierung von modifizierten und transformierten Genen oder DNA-Fragmenten und erfolgte nach der Didesoxyribonukleotid Methode [84]. Dabei werden Fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleotide nach kapillarelektrophoretischer Auftrennung über einen Laser detektiert und chronologisch digitalisiert. Die Sequenzierung erfolgte im ABI 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) nach dem BigDye V 1.1. Protokoll der Firma Applied Biosystems mit folgendem Reaktionsansatz:

BigDye Sequenzierungs-Zyklus (hot start):

Schritt	Temperatur	Zeiten
20 Zyklen		
Denaturierung	96 °C	10 s
Annealing	50 °C	5 s
Elongation	60 °C	4 min
Reaktionstop	4 °C	∞

BigDye Reaktionsansatz:

Inhalt	Mengen / Konzentrationen
BigDyeMix V 1.1.	4,0 µl
Primer (10 pM)	1,0 µl
Plasmid-DNA (~500 ng)	1-5 µl
H ₂ O	ad 10 µl

Die erforderliche Reinigung des Sequenzierungsansatzes wurde mit der Sephadex-Methode wie folgt durchgeführt. Eine zuvor mit Sephadex G-50 Superfine befüllte MultiScreen 96-well Platte (Millipore) wird zum Quellen des Trägermaterials mit 300 µl H₂O für 3-4 h bei 4 °C inkubiert. Nach dem anschließenden entfernen des Wassers (2000 rpm Zentrifugation,

5 min) kann der Sequenzieransatz auf die Platte aufgebracht werden. Dieser wird nach kurzer Inkubationszeit durch eine weitere Zentrifugation (2000 rpm, 5 min) eluiert, welche nun direkt in den ABI 3100 Avant Genetic Analyzer gegeben wird.

2.2.11. Proteinexpression

Im Allgemeinen beschreibt „Genexpression“ den Vorgang der Transkription und Translation einer DNA-Sequenz oder eines Gens in entsprechende Signale, welche häufig in Form von Proteinen vorliegen. Dabei handelt es sich um einen äußerst komplexen Prozess, welcher von verschiedenen Effektoren (beispielsweise Promotoren) beeinflusst oder reguliert wird und die Wahl eines entsprechenden Expressionssystems (Bakterien, Hefen, Insektenzellen) voraussetzt. Durch die Expression ist es möglich, katalytisch aktive oder auch modifizierte Proteine anzureichern und zum Beispiel deren Aktivitäten zu vergleichen.

2.2.11.1. Expression in E. coli DH10B und BL21-RIL

Die rekombinanten und modifizierten Proteine wurden mit den Plasmid-Vektoren pET101/D-TOPO und pALMU3 exprimiert. Die zur Reinigung verwendeten Puffer und Materialien sind im Folgenden aufgeführt:

Materialien:

Ni-NTA-Agarose (Qiagen)
PD 10 Säulen (PD-10 Column Sephadex G-25 M; Amersham Biosciences)
1 M IPTG, steril filtriert.

Puffersysteme:

Lysis-Puffer: 50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol; pH 8,0
Wasch-Puffer: 50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 40 mM Imidazol; pH 8,0
Elutions-Puffer: 50 mM NaH₂PO₄; 300 mM NaCl; 250 mM Imidazol; pH 8,0

Mit den entsprechenden Stammlösungen aus Glycerin wurde über einen Verdünnungsausstrich auf LB-Agar mit spezifischer Antibiotika-Selektion (DH10B, 50 µg/ml Ampicillin; BL21-RIL, 50 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Chloramphenicol) eine Vorkultur (50 ml mit beschriebener Antibiotika-Selektion) angeimpft. Die Inkubation erfolgte über

Nacht bei 37 °C. Danach konnte mit je 1 ml der Vorkultur eine Hauptkultur (500 ml mit beschriebener Antibiotika-Selektion) inokuliert werden, welche nach Inkubation (37 °C) bei einer OD₆₀₀ von 0,6-1,3 mit 100 µM IPTG induziert wurde. Eine entsprechende Prä-induktionskontrolle wurde gesammelt. Durch eine Inkubation bei 28 °C über Nacht (140 rpm schütteln) konnten nach Ni-NTA-Aufreinigung Konzentrationen von bis zu 15 mg an überexprimiertem Protein erhalten werden. Alle folgenden Schritte wurden bei 4 °C durchgeführt, um die Zersetzung oder proteolytischen Verlust des Enzyms zu minimieren.

Nach Zentrifugation (5000 rpm, 10 min, 4 °C) der induzierten Kulturen konnte die eingeeengte Biomasse in 1 x Lysis Puffer resuspendiert und nach Zugabe von ca. 50 mg Lysozym für 30 min auf Eis lysiert werden. Anschließend erfolgte eine Behandlung der Suspension mit Ultraschall 3 x 50 s bei 75% Stärke, um einen vollständigen Aufschluss der Zellen zu gewährleisten. Das Lysat wurde für 20 min bei 4 °C und 10.000 rpm zentrifugiert, der Überstand danach in vorgekühlte 50 ml Reaktionsgefäße überführt. Ein Aliquot (500 µl) als Lysisprobe für ein SDS-Gel wurde gesammelt.

2.2.11.2. Reinigung

Durch zweistündige Inkubation des aufgeschlossenen Rohextraktes mit Ni-NTA Agarose (Qiagen) konnte im Batch-Verfahren eine maximale Konzentration von exprimiertem Enzym an der Agarose gebunden werden. Mindestens 4 Wasch- und Zentrifugationsschritte (2500 rpm) in 1 x Wasch-Puffer mit höherer Imidazolkonzentration sollten unspezifisch über Nickelionen gebundene Proteine bzw. Verunreinigungen durch Zelltrümmer minimieren. Abschließend kann durch Elutionspuffer mit 250 mM Imidazol das 6xHis-Enzym mit einer Reinheit von ~90% von der Agarose gewaschen werden. Die Entsalzung (Imidazol) mit einer PD-10 Säule (Amersham Biosciences) führt zu geringen, aber reproduzierbaren Konzentrationsverlusten. Nach der Reinigung kann Ni-NTA Agarose wiederverwendet werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Reinigung und Entsalzung erfolgte über BCA-Assay mit BSA. (siehe Kapitel 2.2.13.)

2.2.12. *Blot- und Färbetechniken*

Der Western-Blot, auch als Immunblot bezeichnet, dient dem direkten und spezifischen Nachweis von Proteinen durch Antikörper. Eine Grundvoraussetzung dabei ist die Auftrennung der Proteine auf einem Polyacrylamid-Gel und deren anschließende Migration auf eine Trägermembran (Nitrozellulose). In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die so genannte Semi-Dry-Methode mit folgenden Pufferzusammensetzungen angewandt:

Puffersystem	Mengen / Konzentrationen
Transferpuffer	50 mM Tris; 40 mM Glycin; 20% MeOH
TBS-Puffer	10 mM Tris-Cl (pH 7,5); 150 mM NaCl
TBS-Tween/Triton	20 mM Tris-Cl (pH 7,5); 500 mM NaCl; 0,05% Tween 20; 0,2% Triton X-100
Blockierlösung	5% Milchpulver in TBS-Puffer
Ponceau-Rot	2% (w/v) Ponceau-Rot; 0,1% (v/v) Essigsäure; 1,5% (w/v) TCA; 1,5% (w/v) Sulfosalicylat

Vorgefärbte Protein-Marker dienten als Molekulargewichtsstandard. Nach beendeter PAGE wurden die Gele und die Nitrozellulose-Membran ~5 min in Transferpuffer equilibriert. Auf die Anode der Semi-Dry Blotkammer wurde dreilagig, mit Transferpuffer getränktes Whatman-Filterpapier gelegt, darauf die Membran und das Gel, welches wiederum mit drei Lagen puffergetränktem Whatman-Papier abgedeckt wurde. Nach dem Schließen der Blotkammer mit der Kathode erfolgte der Transfer in die Membran durch einen konstanten Strom von 0,8 mA / cm² Membran, welcher bei der gewählten Stromstärke nach 60 min beendet ist. Optional kann nach erfolgtem Blot eine reversible Färbung mit Ponceau-Rot vorgenommen werden. Die Membran kann nun entweder bei 4 °C aufbewahrt, oder nach zweimaligem Waschen in TBS direkt mit 50 ml Blockierlösung mindestens 1 h bei 4 °C inkubiert werden. Nach dem Blockieren, welches auch über Nacht erfolgen kann, wurde 2 x 10 min in TBS-Tween/Triton und 1 x 10 min in TBS gewaschen. Es folgten 60 min Inkubation bei RT mit dem Primärantikörper (Anti-His, 1:5000 Verdünnung in Blockierlösung), Waschen 2 x 10 min TBS-Tween/Triton und 1 x 10 TBS, 60 min Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Rettich-Peroxidase-Konjugat, 1:3000 Verdünnung in

Blockierlösung) und 4 x 10 min Waschen in TBS-Tween/Triton. Abschließend konnte die Detektion mittels ECL (Enhanced Chemo Luminescence) nach Protokoll erfolgen.

2.2.12.1. Färbung mit Coomassie

Bei dieser Methode werden Proteine über eine Komplexbildung der basischen Aminosäureseitenketten und z.T. der Amidgruppen an Kupferionen, unspezifisch mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau R-250 detektiert.

Färbe-Lösung:

0,04% Coomassie-Brilliant-Blau R-250; 40% (v/v) MeOH; 10% Essigsäure; ad H₂O

Entfärbelösung:

10% Essigsäure; ad H₂O

Nach beendeter PAGE wurden die Gele für mindestens 30 min in Färbe-Lösung inkubiert und danach mit Entfärbelösung bis zur gewünschten Farbintensität entfärbt (1-2 h oder länger). Gefärbte Coomassie-Gele können entweder durch Scannen digitalisiert, oder in Folie laminiert werden.

2.2.12.2. Silber-Färbung

Ähnlich der Färbung mit Coomassie erfolgt bei der Silberfärbung eine unspezifische Detektion von Proteinen, obgleich um ein Vielfaches sensitiver. Silbernitrat bindet nichtstöchiometrisch an Proteine. Daher kann diese Methode nicht zur Quantifizierung verwendet werden, da Silbernitrat mehr oder minder stark an Proteine bindet und einige Proteine (z.B. Histone) gar nicht anfärbt.

Nach der Elektrophorese wurden die entsprechenden Gele über Nacht fixiert (40% EtOH; 10% Essigsäure; ad H₂O). Bevor eine kurze Behandlung (> 1 min) mit 0,2 g/l Natriumthiosulfat erfolgte, wurde 2 x 20 min (30% EtOH; ad H₂O) und 1 x 20 (H₂O) gewaschen. Nach der Vorbehandlung und einem kurzen Spülen mit H₂O (3 x 15 sec) erfolgte der eigentliche Färbeschritt (2 g/l Silbernitrat; 750 µl/l Formaldehyd; ad H₂O), welcher nicht

länger als 20 min erfolgen sollte. Die Entwicklung (30 g/l Natriumcarbonat; 4 mg/l Natriumthiosulfat; 500 µl/l Formaldehyd), welche typischerweise nach weniger als 5 min abgeschlossen ist, wurde je nach gewünschter Färbintensität mit 10% Essigsäure gestoppt. Das gefärbte Gel kann sowohl durch Scannen digitalisiert, als auch durch Einlagerung mit 25% EtOH; 3% Glycerin; ad H₂O archiviert werden.

2.2.13. *Konzentrationsbestimmungen*

Um reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, bzw. eine Grundlage für eine Weiterverarbeitung von DNA oder Proteinen zu schaffen, ist es sinnvoll deren Konzentration zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit wurden dafür folgende Methoden verwendet.

2.2.13.1. *Nukleinsäuren*

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Eppendorf Biophotometer bestimmt. Die Nutzung einer Quarzglasküvette ermöglicht eine störungsfreie Messung im UV-Spektralbereich. Eine Absorption von 1,0 entspricht dabei ca. einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

2.2.13.2. *Proteinkonzentration*

Für Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein kolorimetrischer BCA-Assay verwendet. Das Prinzip dieser Methode basiert auf der Komplexierung von Cu²⁺ mit der Peptidbindung und Bicinchoninat (engl. bicinchonic acid), welche eine Färbung proportional zur Konzentration zur Folge hat. Mit Hilfe einer Eichkurve von BSA (engl. bovine serum albumine) konnte die Konzentration des untersuchten Proteins approximiert werden. Die BCA-Methode hat in jedem Fall eine Denaturierung des Proteins zur Folge und kann durch Detergentien gestört werden [85].

2.2.14. *Herstellung von Medien und Agarplatten*

Für die Anzucht von *E. coli* wurde LB-Medium (Luria-Bertani-Medium), [86] verwendet. Dazu wurden 1% (w/v) Pepton/Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt und 1% (w/v) NaCl ad 1 Liter Wasser gelöst (pH 7,0). Für Nährböden wurde dem beschriebenen LB-Medium 1,5% (w/v) Agar zugegeben. Eine Selektion auf Antibiotika (je nach Bakterienstamm 25 µg/ml Chloramphenicol; 50 µg/ml Ampicillin) sollte Fremdinfectionen ausschließen oder als zusätzlicher Promotor dienen.

Auf weitere verwendete Techniken, wie beispielsweise die Herstellung von kompetenten Zellen nach Ausubel oder und andere Standardmethoden wird hier nicht näher eingegangen [87].

3. Resultate und Diskussionen

3.1. Das ubiA-Enzym aus *E. coli*

4-Hydroxybenzoat oligoprenyltransferase von *E. coli*, welches durch das Gen *ubiA* kodiert wird, ist ein überaus bedeutendes und ubiquitär vorkommendes Protein, welches einen hohen Stellenwert im Biosyntheseweg von Ubichinon einnimmt. Das zwei-Substrat-Enzym biokatalysiert die elektrophile aromatische Prenylierung von 4-Hydroxybenzoesäure unter Hydrolyse eines entsprechenden Oligoprenyldiphosphats in Gegenwart von zweiwertigen Metallionen (vorwiegend Magnesium). Das Produkt dieser Reaktion bildet den Anfangspunkt für weitere enzymatische Prozesse, welche letztendlich zu Ubichinon führen. Obgleich die Biosynthese von Ubichinon in pro- und eukaryotischen Organismen bedeutende Unterschiede aufweist, ist doch die spätere Funktion des prenylierten Aromaten als essentieller Elektronenüberträger allen entsprechenden aeroben Lebewesen gleich. Die vom *ubiA*-Enzym katalysierte, formelle elektrophile aromatische Substitution ist in Abbildung 3 (1.1.4.) skizziert. Als aromatische Prenyltransferase wurde *ubiA* bereits 1972 von Young et al. in Zellextrakten von *E. coli* entdeckt [30]. Nishimura et al. lokalisierte das korrespondierende Gen, welches von Heide et al. und Nichols et al. kloniert wurde [31;88]. Das *ubiA*-Enzym ist aus 290 Aminosäuren aufgebaut und hat dementsprechend ein Molekulargewicht von ~32 kDa. Sein membrangebundener Charakter und die Tatsache, dass die Solubilisierung in hypotonischem Puffer oder Detergentien sehr schnell zum irreversiblen Verlust der Aktivität führt, macht es nahezu unzugänglich für die Untersuchung von Reaktionskinetiken. Dennoch kann durch Überexpression des Proteins und Isolation der entsprechenden Membranfraktion das *ubiA*-Enzym, welches ein pH-Optimum von 7,8 hat, angereichert werden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt war eine röntgenkristallographische Analyse von *ubiA* oder homologen Proteinen nicht möglich, daher sind aromatische Prenyltransferasen nach wie vor „weiße Flecken auf der Landkarte“. Die Grundvoraussetzung für das Verständnis der Katalysemechanismen und dementsprechend die Entwicklung von möglichen artifiziellen Liganden, macht das Wissen um die tertiäre Struktur und der Komposition der aktiven Zentren unumgänglich. Dieses Kapitel beschreibt die Entwicklung eines ersten dreidimensionalen Modells, die Charakterisierung von zwei putativen aktiven Zentren mit dem zugehörigen Katalysemechanismus und die zielgerichtete Mutation von verschiedenen Aminosäuren – *in vitro* – welche letztlich zur Veränderung der Aktivität des Enzyms führen sollten.

3.1.1. Suche nach homologen Proteinen und strukturellen Similaritäten

Eine Möglichkeit das Defizit an Informationen und strukturellen Daten über aromatische Prenyltransferasen auszugleichen und Einblicke in mögliche Katalysemechanismen zu erlangen, ist die Entwicklung von dreidimensionalen Computermodellen. Für diesen Zweck ist es notwendig, biologische Datenbanken nach bekannten Proteinstrukturen, mit einer maximalen Ähnlichkeit zum ubiA-Enzym zu durchsuchen. Aus einer Ähnlichkeitssuche mit dem BLAST Algorithmus resultierten keine signifikanten Similaritäten, zu in der PDB hinterlegten 3D-Strukturen. Die Suchroutinen der Programme MOE und Insight (siehe 2.1.8.) hingegen lieferten mehrere 3D-Strukturen, welche für eine Homologie-Modellierung in Betracht kommen, obgleich diese aber nur eine sehr geringe Identität zum gesuchten Protein aufzeigten. MOE beinhaltet eine interne, nicht redundante Strukturdatenbank mit ca. 7000 Einträgen. Zusätzlich ermöglicht die manuelle Wahl der Substitutions-Matrix eine etwa 10% höhere Datenausbeute, verglichen mit dem BLAST-Algorithmus. Der Such-Algorithmus von MOE und Insight beinhaltet im Gegensatz zu BLAST keine Restriktionen in Bezug auf nicht signifikante Bereiche, was zwar eine deutlich langsamere, aber durchaus genauere Similaritätssuche erlaubt. Ferner greift das Programm Insight auf den FASTA-Algorithmus zurück, welcher aufgrund seiner Methodik zusätzliche ähnliche Strukturen oder Homologe zum Zielprotein findet [89]. Als Resultat konnten acht Proteine mit, zumindest limitierter Ähnlichkeit zum ubiA-Enzym identifiziert werden, welche in Tabelle 4 aufgeführt sind.

Tabelle 4: Proteinstrukturen mit den höchsten zum ubiA-Enzym gefundenen Identitäten. Zusätzlich sind die 4-stelligen PDB-Codes und die theoretisch berechnete Hydrophobizität angegeben.

PDB - Code	Name und Quelle der gefundenen Proteinstrukturen	Identität	Hydrophobizität ($\log P_{\text{calc}}$)
5EAS	5-Epi-Aristolochene Synthase (<i>Nicotiana tabacum</i>)	23,2 %	-578,9
1DCE	Geranylgeranyl Transferase (<i>Rattus norvegicus</i>)	21,0 %	-100,1
1PRC	Photosynthesereaktionszentrum (<i>Rh. viridis</i>)	20,9 %	+45,7
1UBW	Farnesyldiphosphate Synthetase (<i>Gallus gallus</i>)	20,2 %	-20,45
1FX8	„Glycerol Facilitator“ (<i>Escherichia coli</i>)	18,1 %	+25,6
3ERD	Humaner Estrogen Rezeptor (<i>Homo sapiens</i>)	18,1 %	-13,9
1OYA	“Old Yellow Enzyme” (<i>Saccharomyces pastorianus</i>)	17,2 %	-21,6
1AD1	Dihydropteroate Synthetase (<i>Staphylococcus aureus</i>)	13,1 %	-67,8

Die Hydrophobizität des Proteins, also der Anteil der hydrophilen Aminosäurereste, welche exponiert und dem Lösungsmittel zugänglich sind, spiegelt direkt dessen Lokalisierung in seiner nativen Umgebung wider. Demzufolge sollte ein membrangebundenes Protein durch eine möglichst große Anzahl von hydrophoben Aminosäuren auf seiner Oberfläche ausgezeichnet sein. Ein Maß für diese Eigenschaft ist der Koeffizient logP, welcher für lösliche Proteine einen negativen Wert annimmt, wohingegen membrangebundene Enzyme durch positive logP Werte ausgezeichnet sind. Die berechneten logP Werte für die zum ubiA-Enzym ähnlichen Proteinstrukturen sind ebenfalls in Tabelle 4 angegeben. Bereits anhand der Kombination von Identität und Hydrophobizität können zwei, als Modellierungstemplate in Betracht kommende Proteine fokussiert werden: das Photosynthesereaktionszentrum von *Rhodospseudomonas viridis* - PDB-Code: 1PRC [90] und der „Glycerol Facilitator“ von *E. coli* – PDB-Code: 1FX8 [91].

Doch für die Entwicklung eines angemessenen Strukturmodells ist nicht allein seine Identität zum Template aussagekräftig, vielmehr sollte auch die vorhergesagte Sekundärstruktur mit der tatsächlichen Sekundärstruktur des generierten Strukturmodells korrespondieren. Für die Sekundärstrukturvorhersage wurden hauptsächlich zwei, über das Internet frei zugängliche Methoden verwendet – phd und 3d-pssm. Die vorhergesagten Sekundärstrukturen sind in einem Sequenzalignment mit dem Photosynthesereaktionszentrum in Tabelle 5 vergleichend übereinander gelegt. Es ist deutlich ersichtlich, dass das Enzym zum überwiegenden Teil aus α -helikalen Bereichen aufgebaut ist, welche über Coil-Regionen miteinander verbunden sind. Ein entsprechendes Alignment für den „Glycerol Facilitator“, hier nicht dargestellt, ist durch eine geringere Übereinstimmung in Hinsicht auf die Sekundärstruktur ausgezeichnet.

Tabelle 5: Sequenzalignment des Photosynthesereaktionszentrum von *R. viridis* mit der Sequenz des ubiA-Enzyms, inklusive vorhergesagter Sekundärstruktur. Blau dargestellt sind α -Helikale Bereiche. β -Faltblätter wurden nicht vorhergesagt.

Sequenz	10	20	30	40	50	60	70	80
lprc (exp.)	-----	ALLSFERKYRVRGGTLIGGDLDFDFWVG	-PYFVGGF	VSA-IFFI	FL-GVSL	IGYAA	SQQGPTWD	--PFAIS
ubiA-phd	MEWSL	TQNKLLAFHR	-LMRTDKPIGA	-LLLLWPTLWALWVATPGVPQ	LWILAVEFVAG	VWLMRAAGCVVNDYADRKF	DGH	
ubiA-3d-pssm	MEWSL	TQNKLLAFHR	-LMRTDKPIGA	-LLLLWPTLWALWVATPGVPQ	LWILAVEFVAG	VWLMRAAGCVVNDYADRKF	DGH	
Sequenz	90	100	110	120	130	140	150	160
lprc (exp.)	INPPDLKYGLGAAPLEGG	FWQAITVCALGAF	-ISWMLREVEI	---SRKLGIGW	HEVPLAFCVPI	FMFCVL	-QVF	---RPL
ubiA-phd	VKRTANR-PLPSGAVTE	KEARALFVVLVLI	SFLLVLT	LNMTILLSIAALALAWV	YPFMKRYTHLP	QVVLGA	AFGWSI	IPM
ubiA-3d-pssm	VKRTANR-PLPSGAVTE	KEARALFVVLVLI	SFLLVLT	LNMTILLSIAALALAWV	YPFMKRYTHLP	QVVLGA	AFGWSI	IPM
Sequenz	170	180	190	200	210	220	230	240
lprc (exp.)	LLGS	WGHAFPYG	----ILSHLDWVNN	FGQYLNWHYN	PGHMSVSV	FLFVNAMALGLHGGL	ILSVAN	PGDGDVKVTA
ubiA-phd	AFAAVSE	SVPLSCWLMFLANILWAVAYDTQYAMV	DRDDDVKIGIK	---STALLF	QGYDKLII	GILQIGV	LALMAI	IGELN
ubiA-3d-pssm	AFAAVSE	SVPLSCWLMFLANILWAVAYDTQYAMV	DRDDDVKIGIK	---STALLF	QGYDKLII	GILQIGV	LALMAI	IGELN
Sequenz	250	260	270	280	290	300	310	320
lprc (exp.)	----	QYFRD	VVGYSIGALS	IHRLGLFLASNIFLTGAFGTIAS	GPFWTRGW	PEWGW	LDIPFWS	-----
ubiA-phd	GLGWGYYSIL	VAGALFVYQ	QKLIANRER	EACFKAFMNNNY	VGLVFLG	LAMSYWHF	-----	-----
ubiA-3d-pssm	GLGWGYYSIL	VAGALFVYQ	QKLIANRER	EACFKAFMNNNY	VGLVFLG	LAMSYWHF	-----	-----

Im Folgenden wurde durch die Erstellung von multiplen Alignments mit 15 verschiedenen 4-Hydroxybenzoat octaprenyltransferasen unterschiedlicher Organismen aus der nicht redundanten Datenbank SWISSPROT eine Identifikation von möglichen katalytisch aktiven Zentren angestrebt. Das Resultat dieser Analyse ist in Tabelle 6 dargestellt. Ashby und Edwards gelang es, zwei Domänen mit der direkten Wiederholung der Konsensus-Sequenz N/DDxxD zu identifizieren, welche als Binderegion für viele Oligoprenyldiphosphate und Hydroxybenzoesäure charakterisiert wurden [28]. Ein Ausschnitt aus dem multiplen Sequenzalignment in Tabelle 6 zeigt die Existenz zweier konservierter Bereiche, wobei D71, D75, D191 und D195 über alle untersuchten Prenyltransferasen vollständig konserviert sind. Es müssen demnach bei der Erstellung des Modells und der darauf folgenden Charakterisierung der aktiven Zentren beide Konsensusregionen berücksichtigt werden. Darüber hinaus wurden weitere, evolutionär sehr hoch konservierte Aminosäurereste in der Sequenz gefunden – R137 und N67. Die oben erörterten putativen aktiven Zentren sind in den Abbildungen 10 und 11 genauer dargestellt.

Tabelle 6: Ausschnitt aus dem multiplen Alignment von verschiedenen 4-Hydroxybenzoat octaprenyltransferasen. Sequenziell über alle Organismen konservierte Bereiche sind rot dargestellt.

Organismus	N-terminaler Bereich	C-terminaler Bereich
<i>Campylobacter pylori</i>	~GFNRLVDRDIDKDNPR~	~FDLLYSLQDMEFDKER~
<i>Helicobacter pylori</i>	~GFNRLVDRDIDKDNPR~	~FDLLYSLQDMEFDKER~
<i>Archaeoglobus fulgidus</i>	~TFNRIIDREIDAKNPR~	~FDMIYGLQDVDFDRSN~
<i>Aquifex aeolicus</i>	~AFNRLIDEPYDRLNPR~	~FDVLYALQDYEFDKYEV~
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	~SLNRVIDEKIDKYNPR~	~FDVIYATQDADYDRER~
<i>Chlamydia trachomatis</i>	~IVNQVVDCAIDKRNPR~	~NDIYALQDVEFDQKE~
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	~TNDNLADIEIDAKNPR~	~FDLYNHIQDAEFDKMK~
<i>Escherichia coli*</i>	~VVNDYADRKFDGHVKRT~	~YDTQYAMVDRDDVKG~
<i>Pasteurella multocida</i>	~VINDYADRHIDGAVKRT~	~YDTQYAMVDRDDLRLIG~
<i>Rickettsia conorii</i>	~IINDIFDRKFDKHVART~	~YDTIYGMDIRDDKIG~
<i>Rickettsia prowazekii</i>	~IINDIFDRKFDKYVERT~	~YDTIYGMDIKDDKIG~
<i>Wolbachia sp.</i>	~IINDIFDRKIDAHVERT~	~YDTIYAHQDKKDEKLG~
<i>Synechocystis sp.</i>	~VVNDWDRDIDPQVERT~	~FDTVYAMADREDDRRIG~
<i>Sulfolobus solfataricus</i>	~VINDVYDVEIDKINK~	~REIVKGIEDYNGDSLNN~
<i>Pyrococcus abyssi</i>	~TINDYFDVEIDRVNR~	~REIMKDIEDIEGDMKM~

Zusammenfassend kann bis hierhin festgehalten werden, dass zwei, voneinander unabhängige Vorlagen für die Homologie-Modellierung des ubiA-Enzyms identifiziert und zwei mögliche aktive Zentren für die Untersuchung des Katalysemechanismus erfasst wurden.

Anhand der resultierenden Tertiärstruktur des Modells, welches aus dem Template „Glycerol Facilitator“ entwickelt wurde, konnte das hoch konservierte N-terminale Sequenzmotiv nicht untersucht werden. Die Anordnung der Aminosäuren erlaubte aufgrund sterischer Behinderungen keine Betrachtung der bekannten Substratspezifität des ubiA-Enzyms [26]. Darüber hinaus sind die oben erörterten Kriterien - Sequenzidentität, Hydrophobizität und Übereinstimmung der Sekundärstruktur - für den „Glycerol Facilitator“ nicht authentisch genug, um ein aussagekräftiges Modell zu erzeugen.

Infolgedessen wird in der vorliegenden Arbeit nur das, auf dem Photosynthesereaktionszentrum basierende Modell detailliert beschrieben und diskutiert.

3.1.2. Homologie Modelling und Strukturverfeinerung

Das membrangebundene Photosynthesereaktionszentrum aus *Rhodospseudomonas viridis* setzt sich als tetrameres Protein aus vier unterschiedlichen Untereinheiten zusammen und ist entsprechend seiner Faltung der Klasse der bakteriellen Photosysteme zuzuordnen. Als solches ist es direkt an der Biokatalyse von Elektronentransportern beteiligt und bindet demnach ähnlich dem Zielprotein Mg-ionen und prenylierte Chinone (Ubichinon 1 und Menachinon 7). Die von Deisenhofer et al. bei 2,30 Å aufgelöste Röntgenkristallstruktur schließt verschiedene Substrate bzw. Liganden ein, unter ihnen Ubichinon 1, Menachinon 7, Metallionen und verschiedene Photosysteme (Phytin B, Chlorophyll). Mit etwa 20% Identität zeigte die 273 Aminosäuren lange Kette L des Tetramers die höchste Ähnlichkeit zum ubiA-Enzym und wurde dementsprechend als Template für die Erstellung eines Homologie-Modells verwendet. Dazu wurden die Sequenzen des Zielproteins und des Templates mit der Substitutions-Matrix BLOSUM35 überlagert und mit dem Programmpaket MOE ein entsprechendes Strukturmodell erstellt. Die Modellingprozedur benutzt eine zufällige Boltzmann-Verteilung, welche das resultierende Modell mittels einer speziellen „Reste-Packungs-Funktion“, in Hinsicht auf die Orientierung von Aminosäureseitenketten und mögliche Wasserstoffbrückenbindungen validiert. Zur Verbesserung der Qualität des Strukturmodells wurden Moleküldynamik-Simulationen und Simulated Annealings auf einzelne Loop-Bereiche angewendet. Das daraus resultierende Modell ist in Abbildung 9

dargestellt und lässt eine parallele Anordnung von fünf möglichen Transmembranhelices erkennen.

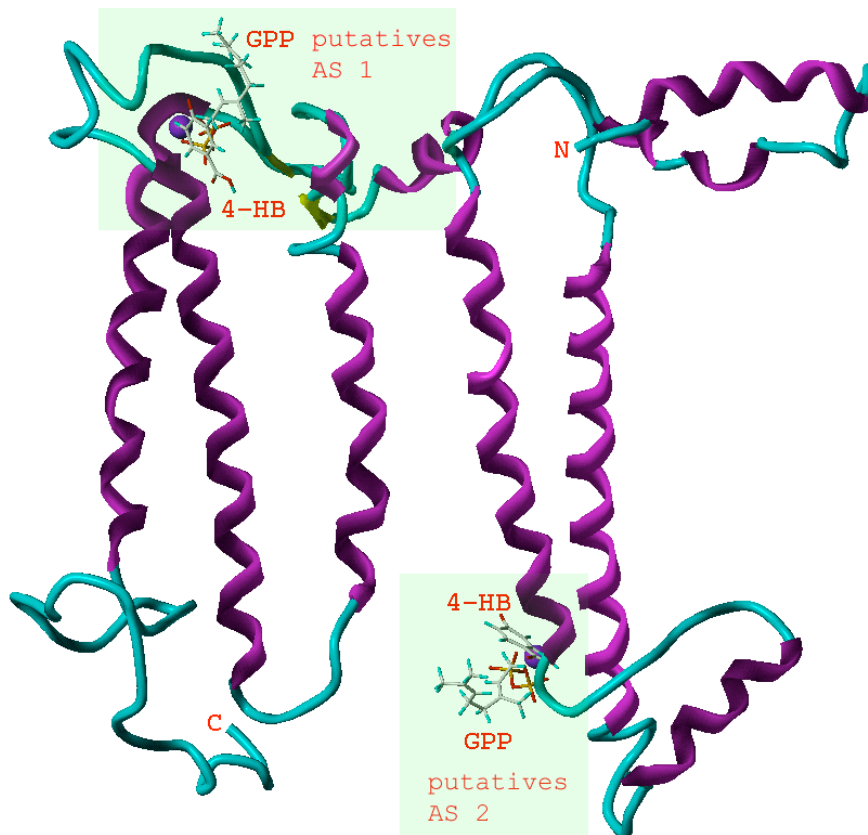


Abbildung 9: Strukturmodell des ubiA-Enzyms, dessen Vorlage das Photosynthesereaktionszentrum bildete. Dargestellt sind die zwei putativen aktiven Zentren mit gebundenem Geranyldiphosphat (GPP) und 4-Hydroxybenzoesäure (4-HB). Die vertikale Länge der Helices entspricht ca. 50 Å und damit der Dicke einer typischen Phospholipidmembran (Doppelschicht).

Die Qualität und Stereochemie des dreidimensionalen Strukturmodells wurde mit dem Programm PROCHECK bei einer theoretischen Auflösung von 2,0 Å getestet. Die Werte für die Torsionswinkel Phi und Psi befinden sich in den erlaubten Bereichen des Ramachandran-Plots (69,5% - meist bevorzugte Bereiche; 30,5% zusätzlich erlaubte Bereiche). Alle anderen sterischen Kriterien, wie Peptidbindungsplanarität, Bindungslängen und -winkel etc. sind innerhalb normaler Parameter, die für ein Protein mit einer Auflösung von 2.0 Å zu erwarten sind.

Die Potentiale der mittleren Energie für C α -Atome, welche mit dem Programm ProsII berechnet wurden, zeigen geringe Diskrepanzen zwischen Modell und Template in bestimmten Regionen der Sequenz.

Es wurden sowohl für das Modell, als und für die Template-Struktur die Z-Werte berechnet, welche zumindest bezüglich der Z-Paar-Potentiale geringe Übereinstimmung zeigen (Z-Paar-Template: -3,91; Z-Paar-ubiA-Modell: -3,49). Auf die Darstellung der Oberflächenpotentiale wurde verzichtet, da diese für ein membrangebundenes Protein (wie in 2.1.7. erläutert) nicht eindeutig sind.

3.1.3. Docking-Studien und Charakterisierung möglicher aktiver Zentren

Anhand der in Tabelle 6 (3.1.1.) erstellten Alignments und deren Übertragung auf die dreidimensionale Modellstruktur konnten zwei, voneinander abgegrenzte Bereiche

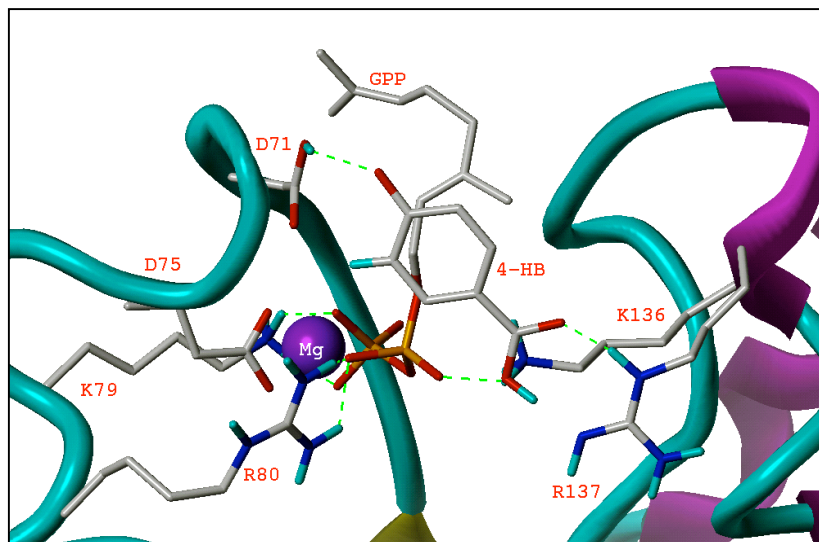


Abbildung 10: Docking Anordnung im möglichen aktiven Zentrum 1. Es sind die Substrate 4-Hydroxybenzoesäure (4-HB) und Geranyldiphosphat (GPP) dargestellt. Die Komplexierung des GPP erfolgt über ein Magnesiumion (Mg).

identifiziert werden, welche als mögliche aktive Zentren in Betracht kommen. Beide sollen in diesem Kapitel ausführlich beschrieben werden. In Abbildung 9 ist zu erkennen, dass ein mögliches aktives Zentrum N-terminal in einer Loop-Region am äußeren Ende einer Transmembranhelix lokalisiert ist.

Aufgrund der Hydrophobizität längerer Prenylketten liegt die Vermutung nahe, dass diese Substrate mit ihren unpolaren Resten in der Membran dynamisch verankert sind, wohingegen sich deren polare Kopfgruppen (Diphosphate) an der Membranoberfläche orientieren und ein Binden an das aktive Zentrum ermöglichen. Der zweite mutmaßliche katalytische Bereich befindet sich im Modell auf der gegenüberliegenden Seite und erlaubt ein vergleichbares Binden des Oligoprenyldiphosphats. Da auch aus eigenen experimentellen Untersuchungen der essentielle Einfluss von Mg^{2+} auf die Enzymaktivität bekannt ist, wurde angenommen, dass zumindest ein Magnesiumion an eines der konservierten Asparate bindet. Die hier

beschriebene Bindung des Magnesiumions mit der Komplexbildung des Diphosphats erfolgt in Analogie zu einer Anordnung der Substrate im aktiven Zentrum der Farnesyl-Diphosphat-Synthase (pdb-code: 1UBY) [41]. Ausgehend vom bereits gebundenen Mg^{2+} wurden Dockingstudien mit GOLD (2.1.7.) am aktiven Zentrum 1 durchgeführt. Dabei wurde sowohl Geranyldiphosphat, als auch *para*-Hydroxybenzoesäure über jeweils zehn Dockingiterationen orientiert. In Abbildung 10 ist das Resultat dargestellt. In dieser Position formt ein Magnesiumion einen tetraedrigen Komplex mit zwei Carboxyl-Sauerstoffen von D75 und parallel dazu bindet es zwei Sauerstoffatome des Diphosphats. Die Asparaginsäurereste bilden somit die Erkennungsfunktion für das Prenyldiphosphat, vermittelt über Mg^{2+} und führen zu dessen Ausrichtung im aktiven Zentrum. Die beiden theoretisch verbleibenden Koordinationsstellen am Magnesium sind im Modell nicht besetzt, wobei unter physiologischen Bedingungen eine Bindung von Wasser nicht völlig auszuschließen ist, um eine octaedrische Ligandensphäre zu komplettieren. Das aromatische Substrat 4-Hydroxybenzoesäure bildet eine Salzbrücke zwischen seiner Carboxylfunktion und der Guanidinogruppe von R137 und ist so über eine ionische Wechselwirkung im aktiven Zentrum verankert. Eine Wasserstoffbrücke zwischen D71 und der phenolischen Hydroxyfunktion der Benzoesäure stabilisiert diese zusätzlich. Weitere hydrophobe Interaktionen zwischen der organischen Seitenkette längerer Prenylketten und dem Enzym, beispielsweise L141 und L256 tragen zur Anordnung der Substrate im aktiven Zentrum bei. Auf diese Weise befinden sich beide Substrate in optimaler Entfernung zueinander, sodass die entsprechende Substitutionsreaktion ermöglicht wird. Um die Relevanz des Modells zu testen, wurden verschiedene Substrate in das aktive Zentrum 1 gedockt. Aus experimentellen Untersuchungen ist bekannt, dass 2-Z-Isomere nicht vom Enzym prenyliert werden und dementsprechend keine Substrate für *ubiA* darstellen [92]. Die resultierende Dockingordnung stützt das experimentelle Ergebnis durch eine niedrigere berechnete Bindungsaffinität ($pKd_{(calc)} = 8,8$) im Vergleich zum *trans*-Isomeren ($pKd_{(calc)} = 10,1$). Schwerwiegender ist allerdings die Tatsache, dass durch das Docken der 2-Z-Prenylkette starke sterische Behinderungen zwischen den betrachteten Substraten und Aminosäureseitenketten entstehen. Diese würden eine Biokatalyse theoretisch nicht zulassen. Das Ergebnis, welches in ähnlichem Maß ebenso für das aktive Zentrum 2 bestätigt werden konnte, bestärkt die Tertiärstruktur des erstellten Modells, zumindest in Hinsicht auf die putativen aktiven Zentren. Das aktive Zentrum 2, welches in Abbildung 11 illustriert ist, weist eine ähnliche Komplexbildung des Magnesiums auf, wie das zuvor beschriebene Motiv im aktiven Zentrum 1. Die konservierten Aminosäurereste D194 und D195 sind maßgeblich

für die Bindung des zweiwertigen Metallions, welches seinerseits das Diphosphat orientiert, verantwortlich. Das aromatische Substrat bindet in kurzer Distanz zum Prenyldiphosphat über ionische Wechselwirkungen zwischen dessen Carboxylgruppe und K212. Eine weitere Wasserstoffbrücke zwischen D191 und der phenolischen OH-Gruppe von 4-Hydroxybenzoesäure fixiert diese zusätzlich im aktiven Zentrum. Die berechnete Affinität für 2-Z-Octaprenyldiphosphat ist (mit $pK_{d(\text{calc})} = 6.1$) deutlich geringer, als die theoretische Bindungsaffinität der *trans*-Form ($pK_{d(\text{calc})} = 9.9$). In der HIV-Integrase (pdb-code:1BIU) kann eine ähnliche Magnesiumkomplexierung über zwei Aspartate gefunden werden [93].

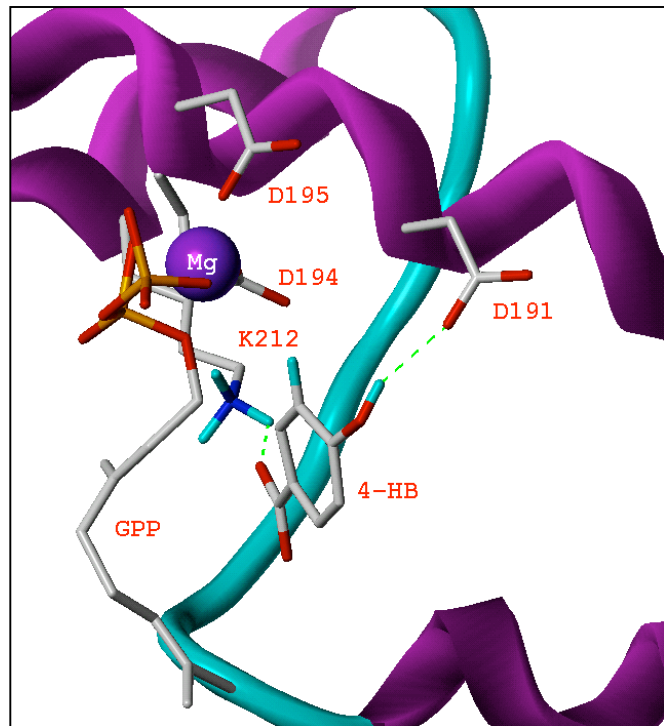


Abbildung 11: Im dargestellten „aktiven“ Zentrum 2 erfolgt die theoretisch mögliche Orientierung des Geranyldiphosphats (GPP) ebenfalls über ein Magnesiumion (Mg). Außerdem ist die Bindung von 4-Hydroxybenzoesäure über Salz- und Wasserstoffbrücken dargestellt.

Magnesiumkomplexierung über zwei Aspartate

3.1.4. Ein möglicher Katalysemechanismus

Um Einblicke in den Mechanismus der Biokatalyse zu erlangen, wurden basierend auf den experimentellen Substratmodellen und der Struktur des aktiven Zentrum 1 semiempirische, quantenmechanische Berechnungen mit PM3 durchgeführt (siehe Abbildungen 12-16). Zur Vereinfachung und zur Verkürzung der Rechenzeit wurden alle in Betracht gezogenen Aminosäureseitenketten auf ihre reaktiven Funktionen reduziert (Acetat bzw. Essigsäure repräsentiert Aspartat oder Asparaginsäure, Methylammonium repräsentiert Lysin, Methylguanidinium repräsentiert Arginin). Durch Fixieren und Distanzbeschränkungen der Methyl-Kohlenstoffatome konnte die relative Rigidität des Proteinerückgrates simuliert werden. Dimethylallyldiphosphat, als ein Modell für alle Prenyldiphosphate, bindet in Analogie zu typischen Mg^{2+} Bindungsmotiven über einen tetraedrischen Metallkomplex an

Magnesium, welches seinerseits durch D75 im aktiven Zentrum verankert ist. 4-Hydroxybenzoesäure wird, wie bereits beschrieben über eine Salzbrücke zu R137 und eine Wasserstoffbrücke zu D71 gebunden. Durch eine schrittweise Spaltung der Bindung zwischen Diphosphat und dem Dimethylallylrest (C1' – OPP) und der gleichzeitigen Annäherung des gebildeten Carbokations an 4-Hydroxybenzoesäure (C-1' – C-3) konnte eine komplette Energiehyperfläche mit einem Hauptgitterabstand von 0,1 Å für diese beiden Koordinaten berechnet werden. Für jeden Gitterpunkt wurden die entsprechenden Abstände fixiert, das gesamte System mit PM3 optimiert und die korrespondierenden Energien berechnet.

Außerdem sollte die Kalkulation zur Entscheidungsfindung beitragen, ob der bevorzugte Reaktionsmechanismus eher einem S_N1- oder einem S_N2-Typ entspricht, bzw. welcher Mischtyp im zeitlichen Verlauf vorliegt. Abbildung 12 zeigt die resultierende Energieoberfläche deren unterschiedliche Energiebeträge (Summe der Bildungsenthalpien des gesamten Systems) durch verschiedene Farben repräsentiert werden.

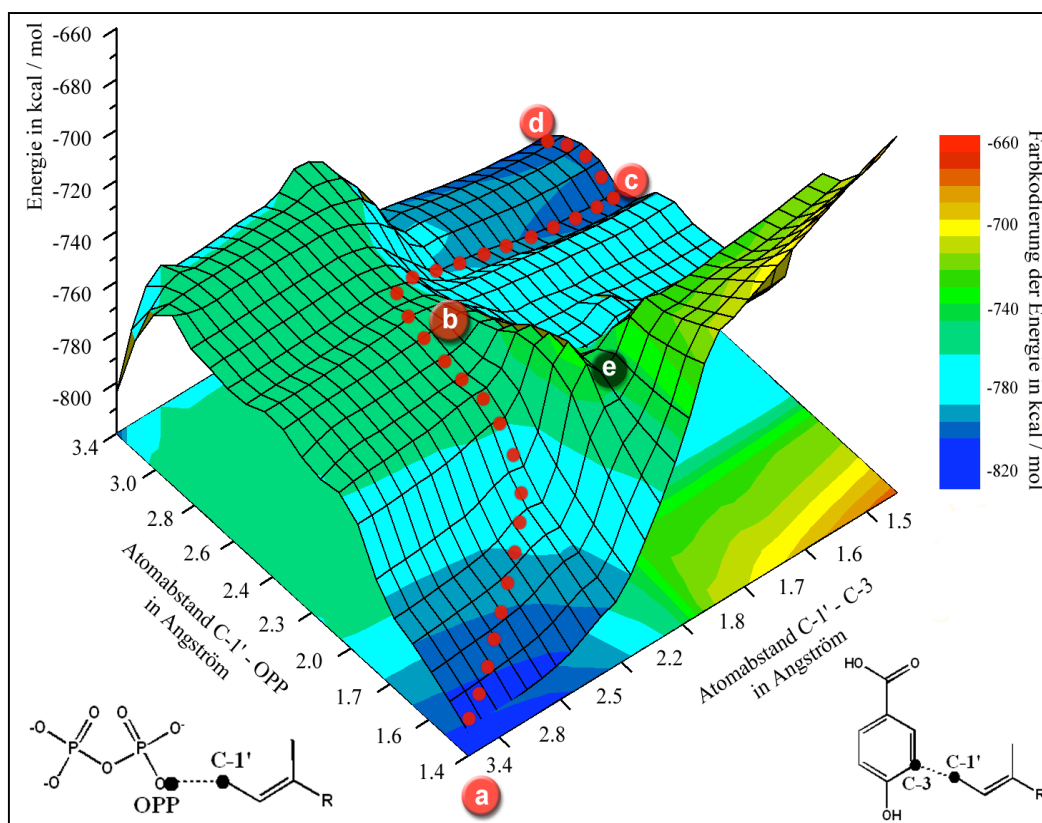


Abbildung 12: Interpolierte Energiehyperfläche der aromatischen Prenylierung. Die Energien für die Gitterpunkte resultieren aus semiempirischen quantenmechanischen Berechnungen (PM3). (a)-Startgeometrie (-816,18 kcal/mol); (b)-Übergangszustand (-755,3 kcal/mol); (c)-σ-Komplex (-800,6 kcal/mol); (d)-Produktgeometrie (-832,68 kcal/mol); (e)-Übersichtspunkt, liegt 20 kcal/mol über (b)

Die Reaktion hat ihren Startpunkt bei einer Energie von -816,2 kcal/mol, welcher der geometrischen Anordnung der reaktiven Spezies in Abbildung 13 entspricht. Die Bindungslänge der Phosphoesterbindung (α -Phosphor-Sauerstoff – C-1') beträgt 1,4 Å wohingegen das bindungsbildende C-1' Atom 3,5 Å vom C-3 Atom der 4-Hydroxybenzoesäure entfernt ist. Der Weg der minimalen Energie führt zum Übergangszustand der Reaktion, welcher in Abbildung 14 wiedergegeben ist und einer Barriere von 61 kcal/mol entspricht (Bildungsenthalpie des gesamten Systems am Übergangszustand -755,3 kcal/mol). Das aktivierte allylische Kation C-1' nähert sich dem C-3 Atom der Benzoesäure bis auf eine Distanz von 2,48 Å, wohingegen der α -Phosphoester nahezu gespalten ist (Abstand C-1' – OPP = 2,4 Å). Jeder Pfad mit kürzeren C-1' – C-3 Abständen und gebundenem Diphosphat führt letztlich zu höheren Energiebarrieren und damit höheren Aktivierungsenergien. Nach dem Passieren des Übergangszustandes bildet sich ein für aromatische Substitutionen typischer σ -Komplex aus, welcher als Intermediat der Reaktion (-800,6 kcal/mol) in Abbildung 15 gezeigt ist. Die Abstände für die optimierte Struktur betragen 2,8 Å für C-1' – OPP und 1,53 Å für C-1' – C-3. Lediglich eine kleine Aktivierungsenergie von 4,7 kcal/mol ist erforderlich um zum Endprodukt zu gelangen, welches in Abbildung 16 dargestellt ist und einer Energie von -832,68 kcal/mol entspricht. Letztendlich hat sich das Diphosphat mit einer Entfernung zum C-1' Atom von 3,5 Å komplett abgespalten und die Bindung zwischen C-1' und C-3 hat sich mit einem Abstand von 1,49 Å etabliert. Der Transfer des C-3-Protons auf den Sauerstoff des α -Phosphats, welcher während der Reaktion zugänglich wurde, erfolgt vermutlich simultan zur Ausbildung der C-1' – C-3 Bindung und erfordert keinerlei zusätzliche Aktivierungsenergie.

Die heterogene Bindungsspaltung (C-1' – OPP), verglichen mit der Bindungsknüpfung (C-1' – C-3) lässt einen tendenziellen Reaktionsverlauf nach S_N1 vermuten. Betrachtet man jedoch Abbildung 12, so ist das Erreichen des Übergangszustandes (b) nicht nur mit der Vergrößerung der Distanz C-1' – OPP, sondern gleichzeitig auch mit einer Annäherung C-1' – C-3 verbunden. Diese Tatsache würde eher einem konzertierten Mechanismus entsprechen. Es kann also bei der betrachteten aromatischen Prenylierung nicht eindeutig zwischen S_N1 - oder S_N2 -Mechanismus unterschieden werden.

Der komplette Formalmechanismus der Prenylierung, inklusive der gebildeten Intermediate, sowie die Analyse der Substratspezifität soll in Kapitel 3.1.5. beschrieben werden.

Abbildung 13: Startgeometrie der reaktiven Spezies im aktiven Zentrum 1. Dimethylallyl-diphosphat (DMA-OPP) und D75 werden über Magnesium tetraedrisch komplexiert. Zusätzliche Wasserstoffbrücken (D71 und R80) bzw. ionische Wechselwirkungen (R137) orientieren die 4-Hydroxybenzoesäure (4-HB). (entspricht Abb. 12a)

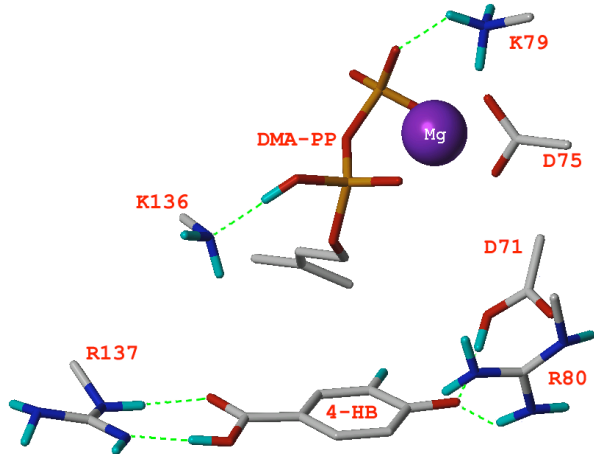


Abbildung 14: Übergangszustand der aromatischen Prenylierung im aktiven Zentrum 1. Die Carboxylgruppe der 4-Hydroxybenzoesäure (4-HB) ist leicht aus ihrer planaren Ebene gedreht. Dies verursacht eine Isolation der π -Elektronen des Aromaten. Dadurch wird eine direkte Wechselwirkung zwischen dem allylischen Kation und C-3 ermöglicht. (entspricht Abb. 12b)

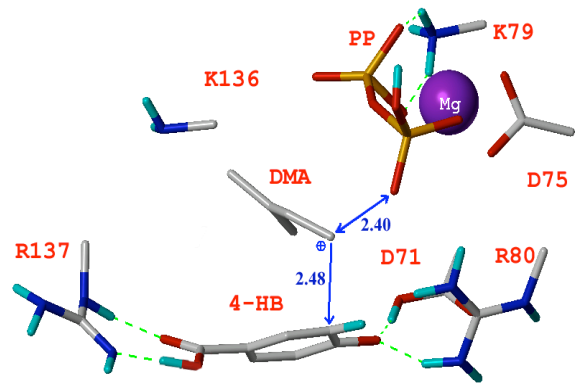


Abbildung 15: Geometrie des σ -Komplexes im aktiven Zentrum 1. Die Bindung zwischen C-1' und dem Phosphatsauerstoff ist mit 2,8 Å ionisiert. Eine kleine Veränderung der Orientierung des Diphosphats und des aromatischen Rings verursacht eine Verringerung der Distanz zwischen dem C-3-Proton und dem Sauerstoff des α -Phosphats. Dadurch wird eine Protonenübertragung favorisiert. (entspricht Abb. 12c)

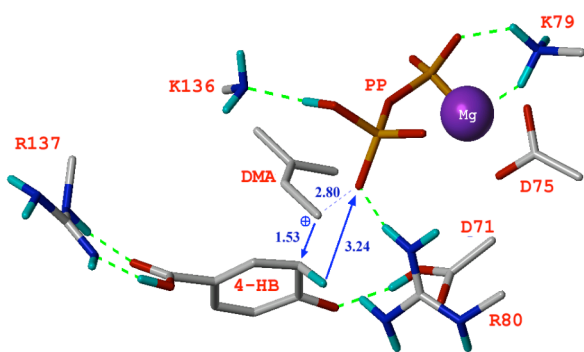
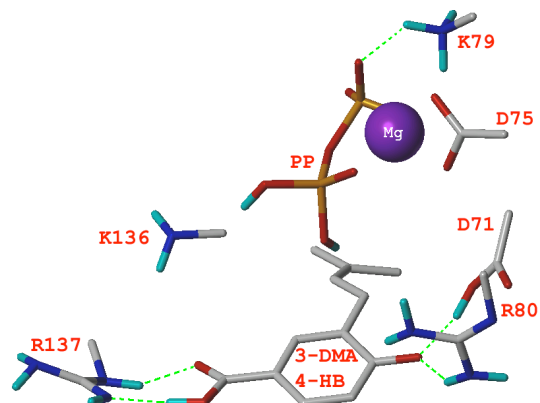


Abbildung 16: Geometrie im aktiven Zentrum 1 nach der Prenylierung. Das Proton von C-3 ist komplett auf den Sauerstoff des α -Phosphats transferiert. 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure und das abgespaltene Diphosphat (PP) können nun aus dem aktiven Zentrum diffundieren. (entspricht Abb. 12d)



3.1.5. Quantenmechanische Analyse der Substratspezifität des ubiA-Enzyms

Verschiedene Derivate der Hydroxybenzoesäure wurden für das ubiA-Enzym experimentell – *in vitro* – getestet, wobei sich herausstellte, dass einige von ihnen katalytisch umgesetzt werden, andere hingegen nicht [26]. Das Docking der Hydroxybenzoesäurederivate in das aktive Zentrum 1 zeigt, dass prinzipiell alle Substrate adäquat binden können und somit eine Katalyse erlauben würden. Daher ist es relativ offensichtlich, dass für die Spezifität des aromatischen Substrats hauptsächlich elektronische Eigenheiten eine dominante Rolle spielen müssen. Wie bereits diskutiert, resultiert die Orientierung der Benzoesäure im Enzym aus ionischen Wechselwirkungen und einer Wasserstoffbrücke. Anhand dieser Annahmen konnte die Lage des chemischen Gleichgewichtes in Bezug auf die Protonierung bzw. Deprotonierung der phenolischen OH-Gruppe und der Carboxylgruppe bestimmt werden. In Abbildung 17 sind die Ergebnisse der Berechnungen der Bildungsenthalpien (ΔH) und Reaktionsenthalpien ($\Delta_R H$) für die Deprotonierung der phenolischen OH-Gruppe an 4-HB dargestellt. Es handelt sich dabei um die Bildungsenthalpien der isolierten Spezies, welche im Enzym durch zusätzliche Faktoren, wie beispielsweise den pH-Wert beeinflusst werden. Dennoch spiegelt die Reaktionsgleichung in Abbildung 17 wider, dass eine deprotonierte phenolische OH-Gruppe thermodynamisch begünstigt ist. Dadurch wird die Nucleophilie an C-3 erhöht, wie in Abbildung 18 dargestellt, und eine Prenylierung an dieser Position ermöglicht.

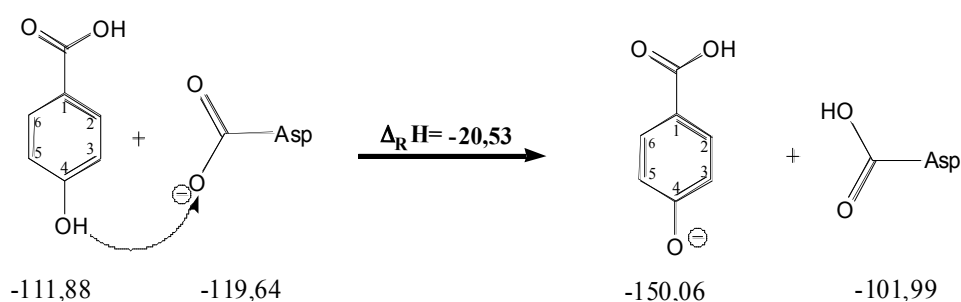


Abbildung 17: Formale Reaktionsgleichungen zur Bestimmung der Lage des chemischen Gleichgewichtes, zwischen protonierter und deprotonierter phenolischer OH-Gruppe von 4-HB-Derivaten

Aus thermodynamischer Sicht war evident, dass entgegen der Annahme eines Carboxylat-Anions und einer phenolischen OH-Gruppe, in der Enzymtasche nach der Berechnung eine inverse Deprotonierung vorliegt und der Aromat als Carboxylsäurederivat mit negativem Phenolat begünstigt ist. Eine derartige Deprotonierung ist, wie bereits erwähnt, von immenser

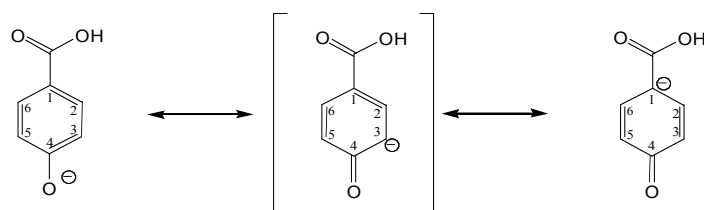


Abbildung 18: Mesomere Resonanzstrukturen von 4-HB mit deprotonierter 4-Hydroxygruppe und protonierter Carboxylgruppe

Bedeutung für die Katalyse, da das Anion an der phenolischen OH-Gruppe zu einer Verschiebung und Verstärkung der Ladung in 3-Position des Aromaten führt und damit die Reaktion mit dem C-1' des allylischen Kations in dieser Position ermöglicht (siehe Abbildung 18).

Da die Gesamtreaktion für alle untersuchten aromatischen Substrate thermodynamisch begünstigt ist (vorletzte Spalte in Tabelle 7) ist davon auszugehen, dass die unterschiedlichen Reaktivitäten der Substrate bzw. Nicht-Substrate kinetische oder sterische Ursachen haben. Erstere sind durch die jeweiligen Übergangszustände determiniert. Sterische Wechselwirkungen zwischen Ligand und Enzym sind leider zu fein, um sie in diesem Modell zu charakterisieren.

Letztendlich wurden ausgehend von der oben beschriebenen Protonierung des Aromaten die Energien aller Intermediate der experimentellen 4-Hydroxybenzoesäurederivate berechnet (siehe Tabelle 7) und ein schematischer Reaktionsmechanismus formuliert (siehe Abbildung 19). Anhand der Energiedifferenz zwischen den σ -Komplexen (C) und den Edukten (A) der Reaktion zeichnet sich ab, dass zulässige und tatsächlich akzeptierte Substrate ca. 4 bis 9 kcal/mol ($\Delta_R H^\ddagger$ in Tabelle 7) gegenüber den nicht umgesetzten Substraten (*kursiv in Tabelle 7*) bevorzugt sind. Nach der Hammett-Gleichung korreliert man eine kinetische Größe mit einer thermodynamischen, um auf eine Wechselbeziehung von Reaktivität und Struktur zu schließen. Betrachtet man $\Delta_R H^\ddagger$ in Tabelle 7, stellt allein die Bildung des Übergangszustandes und demnach auch des σ -Komplexes eine Barriere für nicht umsetzbare Substrate dar. Die dabei einzige Ausnahme bildet 4-Hydroxyphthalsäure, welche aufgrund ihrer beiden benachbarten Carboxylsäuren möglicherweise eine andere Interaktion mit der Guanidinogruppe von Arg137 eingeht und demzufolge eine entsprechende Wechselwirkung mit Dimethylallyldiphosphat verhindert.

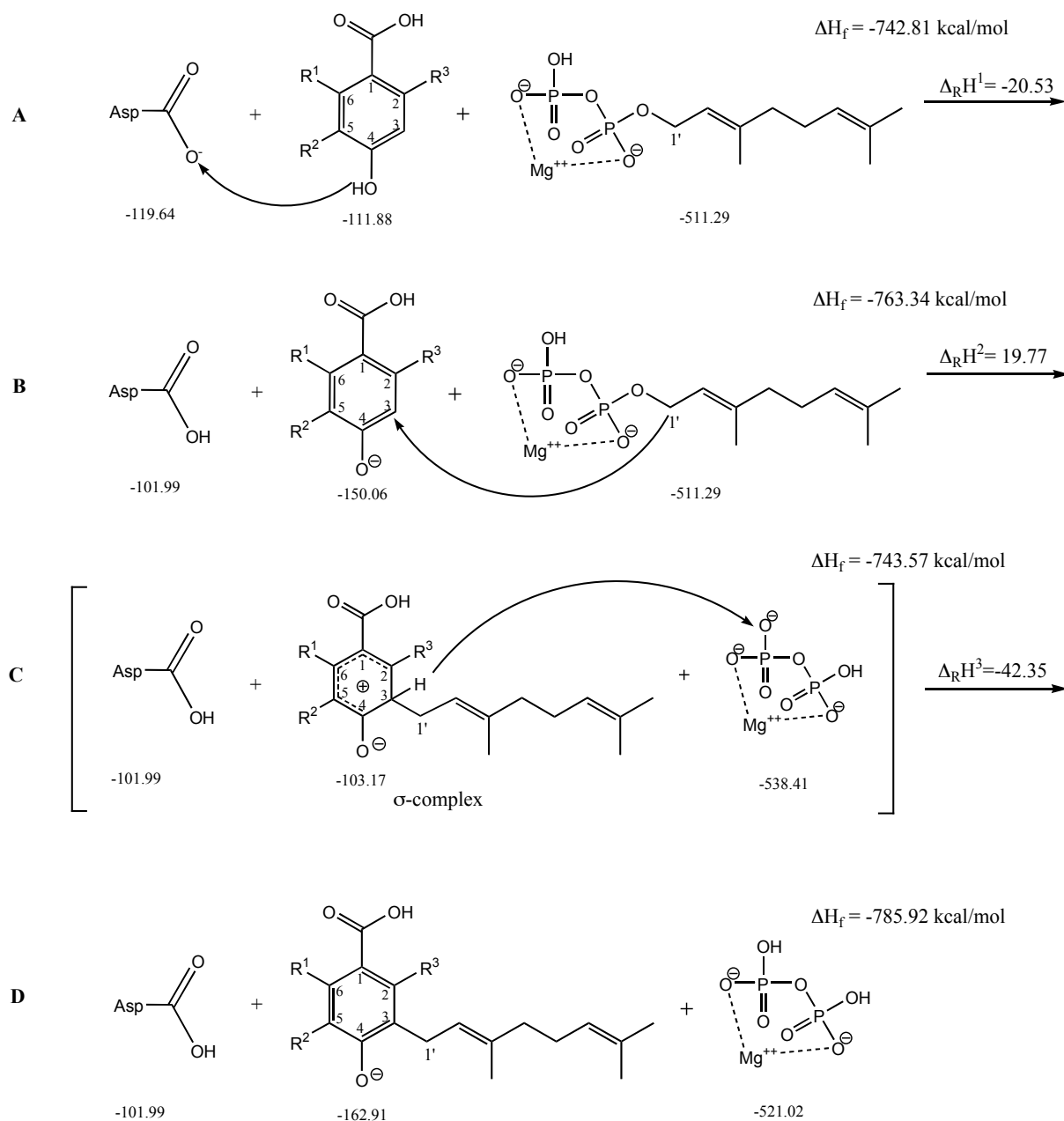


Abbildung 19: Möglicher Reaktionsmechanismus für die Prenylierung von 4-Hydroxybenzoesäure mit Geranyldiphosphat, inklusive der möglichen Intermediate (alle Werte in kcal/mol). Die Reaktion startet mit der Deprotonierung (Aktivierung) der phenolischen Gruppe durch Aspartat (A). Geranyldiphosphat wird zur Abspaltung des Diphosphats als Magnesium-Komplex aktiviert (B). Das *ortho*-C-1' wird nun elektrophil substituiert und der für diese Reaktion typische σ -Komplex bildet sich unter Abspaltung und Übertragung des C-3-Protons auf den Sauerstoff des α -Phosphats (C). Die Produkte der Reaktion bilden sich (D). Aspartat wird regeneriert, indem es das Proton auf die phenolische Gruppe des prenylierten Aromaten überträgt (nicht dargestellt). Die thermodynamische Bilanz der gesamten Reaktion beträgt -43,11 kcal/mol. Um eine einheitliche Nummerierung des Aromaten zu gewährleisten, weicht diese vom IUPAC-Standard ab und orientiert sich am Endprodukt.

Tabelle 7: Berechnete $\Delta_R H$ and $\Delta_R H^\#$ Werte für Benzoesäurederivate in kcal/mol

Verbindung	Edukte (A)	Deprot (B)	Sigma (C)	Produkte (D)	$\Delta_R H^\#$	$\Delta_R H$	Exp. (%*)
3-Chloro-4-hydroxybenzoesäure	-748.72	-773.17	-752.5	-795.57	-3.78	-46.85	21
2,4-Dihydroxybenzoesäure	-791.25	-813.7	-794.13	-835.83	-2.88	-44.58	20
2,3,4-Trihydroxybenzoesäure	-830.59	-855.85	-833.63	-877.82	-3.04	-47.23	9
4-Hydroxybenzoesäure	-742.81	-763.34	-743.57	-785.92	-0.76	-43.11	100
<i>3-Nitro-4-hydroxybenzoesäure</i>	<i>-753.03</i>	<i>-789.38</i>	<i>-749.16</i>	<i>-807.55</i>	<i>3.87</i>	<i>-54.52</i>	<i>0</i>
<i>3-Chloro-4-aminobenzoesäure</i>	<i>-706.11</i>	<i>-716.39</i>	<i>-700.38</i>	<i>-737.05</i>	<i>5.73</i>	<i>-30.94</i>	<i>0</i>
<i>4-Hydroxyphthalsäure</i>	<i>-827.43</i>	<i>-860.73</i>	<i>-827.75</i>	<i>-873.4</i>	<i>-0.32</i>	<i>-45.97</i>	<i>0</i>
<i>2,4,6-Trihydroxybenzoesäure</i>	<i>-838.31</i>	<i>-861.69</i>	<i>-833.4</i>	<i>-875.97</i>	<i>4.91</i>	<i>-37.66</i>	<i>0</i>

Das bevorzugte Substrat *in vivo* ist fett dargestellt. Zusätzlich sind Substrate dargestellt, welche außerdem vom Enzym akzeptiert werden, wobei kursive Verbindungen nicht durch das ubiA-Enzym umgesetzt werden. Diese gehen konform mit den berechneten $\Delta_R H^\#$ Werten, außer 4-Hydroxyphthalsäure, deren Nichtumsetzung vermutlich sterische Ursachen hat. $\Delta_R H^\#$ Werte sind definiert über $\Delta_R H^\# = \text{sigma (C)} - \text{educts (A)}$. Nach der Hammett-Gleichung korrelieren die $\Delta_R H^\#$ Werte mit der Geschwindigkeitskonstanten für die jeweiligen unterschiedlich substituierten Derivate. *Experimenteller Umsatz in % nach HPLC / DAD [26]

Mit Hilfe der durchgeführten semiempirischen Berechnungen konnte ermittelt werden, dass 4-Hydroxybenzoesäure wahrscheinlich als Monoanion (deprotonierte Hydroxygruppe) in den Katalysemechanismus eingeht. Darüber hinaus war es möglich anhand der quantenmechanischen Berechnungen (σ -Komplexe, etc.) die experimentellen Substratspezifitäten zu interpretieren.

Die theoretischen Resultate bieten nun Ansatzpunkte für molekularbiologische Analysen und Mutationsstudien. Diese sollen helfen die Aussagekraft des entwickelten Modells in Hinsicht auf dessen Tertiärstruktur zu bewerten. Weiterhin könnte dadurch die Existenz eines zweiten möglichen aktiven Zentrums, wie in 3.1.3. beschrieben, verifiziert werden. In den folgenden Kapiteln (3.1.6. und 3.1.7.) soll die Vorgehensweise bei der Entwicklung entsprechend mutierter ubiA-Enzyme beschrieben und deren Einfluss auf die Aktivität ermittelt werden.

3.1.6. Punktmutationen an möglichen aktiven Zentren

Mit der Kenntnis über die dreidimensionale Anordnung einzelner Aminosäuren in den beiden, bereits – *in silico* – untersuchten aktiven Zentren sollte nun durch direkte Mutagenese eine Veränderung der Substratspezifität bzw. eine Veränderung der Aktivität des ubiA-Enzyms möglich sein. Weiterhin müsste am Resultat der Mutation zu ersehen sein, ob die Anordnung der Aminosäuren im aktiven Zentrum des Modells bestätigt, bzw. eine Aussage über das zweite aspartatreiche Sequenzmotiv getroffen werden kann. Anhand des beschriebenen Modells wurden fünf Aminosäurereste ausgewählt, welche zielgerichtet mutiert werden sollten: D71A, D75A, R137A (putativ aktives Zentrum 1) und D191A bzw. D195A (putativ aktives Zentrum 2). An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass nicht allein Aminosäuren aus dem charakteristischen N/DDxxD-Motiv für einen Alaninaustausch ausgewählt wurden, sondern darüber hinaus beispielsweise auch D75 und R137, deren eventuelle Notwendigkeit im Katalysemechanismus nur über das Modell abgeschätzt werden konnte. Alle ausgesuchten Aminosäuren sind dabei mutmaßlich an der Bindung des Aromaten oder aber an der Komplexierung des Magnesiums und dementsprechend an der Bindung des Prenyldiphosphats während des Katalysemechanismus beteiligt. Ein Austausch gegen Alanin und dementsprechend eine Eliminierung der charakteristischen Gruppen (Carboxylgruppe bei Aspartat, bzw. Guanidino-Funktion bei Arginin) und damit auch Ladungen, sollte zu einer Verminderung oder letztendlich sogar zum vollständigen Verlust der Aktivität des ubiA-Enzyms führen. Alanin eignet sich für dieses Vorhaben besonders gut als Komplement, da (bedingt durch das relativ kleine Volumen der neutralen Aminosäure) mit einer entsprechenden Mutation keine weit reichenden sterischen Änderungen am aktiven Zentrum zu erwarten sein sollten. Weiterhin ist nicht davon auszugehen, dass der Austausch gegen Alanin zu einer Fehlfaltung des Proteins führt und dieses dementsprechend „falsch“ oder gar nicht in die Membran integriert wird.

Mittlerweile sind diverse Protokolle beschrieben, mit Hilfe von PCR *in vitro* DNA zu mutieren. Die meisten Methoden setzen die Nutzung von ssDNA als Template voraus und erlauben innerhalb weniger Schritte eine genotypische Modifikation. Beginnend mit einer modifizierten Technik nach Kunkel et al. wurden die entsprechenden 5' und 3' Mutationsprodukte amplifiziert [94]. Dennoch scheiterte jeder Versuch die beiden komplementären Stränge zu kombinieren und damit den gewünschten Leserahmen zu komplettieren. In weiteren zahlreichen Ansätzen konnte auch mit den Vorschriften nach Ke et

al. und Tyagi et al. nicht das erwartete PCR-Produkt erarbeitet werden [95;96]. Ebenso wenig führten diverse Primer-, Temperatur- und Puffervariationen zum erwarteten PCR-Produkt. Schließlich, unter Verwendung des Accuprime Pfx Supermix (Invitrogen) in Kombination mit einer besonders leistungsfähigen DNA-Polymerase gelang die Amplifikation des gesamten Vektors pALMU3 [97]. Der Vorteil des verwendeten Protokolls liegt vermutlich darin, dass ein doppelsträngiges DNA-Template verwendet und der Vektor ohne Zwischenschritte elongiert werden kann. In Abbildung 20 ist ein entsprechendes Agarose-Gel mit den linearen PCR-Produkten bei ca. 4,9 kB dargestellt.

Nach Restriktionsverdau der maternalen Stränge mit DpnI und Reinigung des PCR-Produktes wurden die mutierten Konstrukte in kompetente *E. coli* DH10B transformiert, in

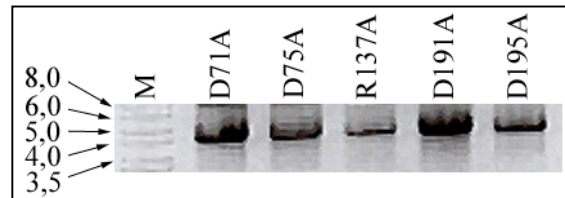


Abbildung 20: DNA-Agarose-Gel mit den entsprechenden, die Punktmutation tragenden, linearen Plasmiden. Die Größe des Markers ist in kB angegeben.

welchen auch die anschließende rekombinante Proteinexpression gelang. Sequenzierungen (MWG) der mutierten *ubiA*-Gene zeigten keinerlei spontane Veränderungen an der kodierenden Sequenz oder eine Verschiebung des ORF, abgesehen von den gewünschten mutagenisierten Aminosäuren.

Nach Expression der Konstrukte und Anreicherung der entsprechenden Membranfraktion (Zentrifugation des lysierten Zellextraktes bei 50.000 rpm für 1,5 h) wurde die enzymatische Aktivität mittels Bioassay bestimmt. Diese sollte direkt mit der Aktivität des unveränderten *ubiA*-Enzyms (pALMU3), welches unter den gleichen Konditionen kultiviert und exprimiert wurde, verglichen werden. Es muss aber darauf hingewiesen werden, dass ein quantitativer Produktvergleich nicht eindeutig ist, da eine Aufreinigung des aktiven Genproduktes von *ubiA* und eine anschließende Konzentrationsbestimmung aufgrund des membrangebundenen Charakters unmöglich ist. Die entwickelten mutierten Enzyme wurden mit freundlicher Unterstützung von S. Zakharova auf ihre Aktivitäten bezüglich der Bildung von 3-Geranyl-4-hydroxybenzoat getestet [98]. Alle Mutanten, ausgenommen R137A zeigten einen kompletten Verlust ihrer nativen Aktivität. Der Austausch von Arginin137 zu Alanin resultierte in einer über 90% verringerten Bildung des Produkts, welche in Abbildung 33 (Anhang) dargestellt ist. Diese Beobachtung bestätigt zwar die in Kapitel 3.1.1. erörterte Existenz von zwei aktiven Zentren, wirft aber zugleich folgendes Problem auf. Mit dem in Abbildung 9 dargestellten Modell lässt sich ein derartiger Aktivitätsverlust nicht erklären, da wie in Kapitel 3.1.2. beschrieben, beide aktive Zentren voneinander unabhängig

biokatalytisch aktiv sein sollten. Demnach müsste zumindest Restaktivität für die Asp-Ala-Mutanten zu erwarten sein.

Aus vorangegangenen Untersuchungen ist eine Hydrolase-Phosphorylase-Aktivität des ubiA-Enzyms bekannt. Diese könnte genutzt werden, um eventuelle, durch die Mutation verursachte Fehler bei der Faltung bzw. Expression des Proteins auszuschließen. Dabei sollte, insofern das Protein nativ gefaltet ist, eine Hydrolaserestaktivität zu verzeichnen sein, welche durch das jeweils unmutierte aktive Zentrum vermittelt wird. Die Dephosphorylierung von GPP durch unspezifische Phosphatasen, welche als Verunreinigungen in der Membranfraktion enthalten sind, wurde bei diesem Experiment durch NaF vermindert, welches bei 1 mM eine maximale Inhibierung zeigte [99]. Zwar wird auch das ubiA-Enzym geringfügig durch NaF in seiner Aktivität modifiziert, jedoch nur bei hohen Konzentrationen (Wessjohann, nicht publiziert). Nach Minimierung der unspezifischen Phosphatasereaktion erfolgte eine zweistündige

Inkubation des Enzyms bei 37 °C in Abwesenheit der 4-Hydroxybenzoesäure. Tatsächlich konnte für alle Mutanten einschließlich des unveränderten pALMU3 deutliche Hydrolaseaktivität verzeichnet werden. Diese ist für die Mutanten zwar schwächer, als für das unmodifizierte pAMLU3, lässt aber auf die oben angenommene Restaktivität und dementsprechend native Faltung des ubiA-Enzyms schließen. In Abbildung 21 ist dieser Effekt schematisch dargestellt.

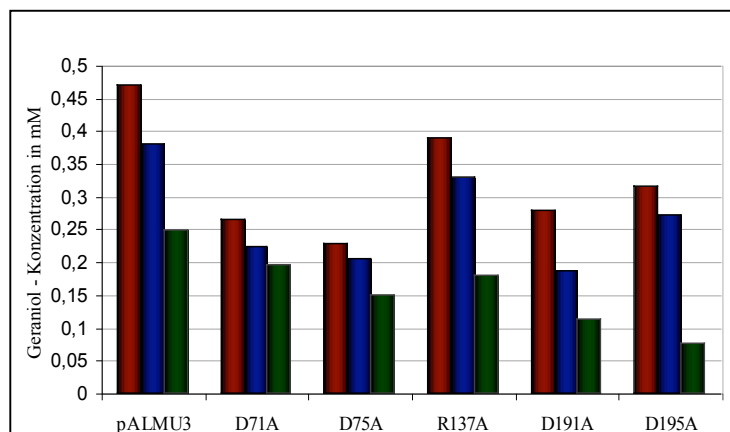


Abbildung 21: Hydrolyse von Geranyldiphosphat als Resultat der Phosphataseaktivität des ubiA-Enzyms. Alle Werte entsprechen der Geraniolkonzentration nach 2h Inkubation bei 37 °C in Abwesenheit von 4-Hydroxybenzoesäure. Rote Balken – Geraniolbildung ohne Phosphataseinhibitor (NaF); blaue Balken – GPP-Hydrolyse als Restaktivität nach Phosphataseinhibierung mit 1 mM NaF; grüne Balken – Hintergrund-Phosphatabsplattung nach Hitzeenturierung (5 min 96 °C)

Eine eindeutige Aussage über die native Faltung des Enzyms kann letztendlich nur über eine Kristallstrukturanalyse getroffen werden. Diese ist aufgrund der irreversiblen Aktivitätsverluste durch Aufreinigung des ubiA-Enzyms momentan nicht möglich. Trotzdem kann die Visualisierung auf einem SDS-Gel zumindest Aufschluss über die Expression des entsprechenden Genproduktes geben. Nach derzeitigem Erkenntnisstand ist die Detektion des ubiA-Enzyms über Coomassie- oder Silberanfärbung aus diversen Gründen nicht möglich.

Dennoch wurden hier verschiedene Versuche unternommen, eine Auftrennung und Färbung über ein SDS-Gel zu erreichen, wie im folgenden Kapitel beschrieben wird.

3.1.7. Zwei Hexahistidyl-Konstrukte

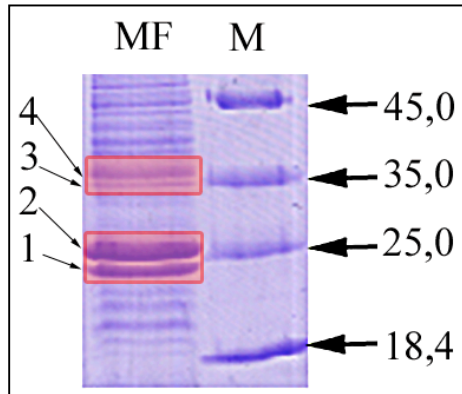


Abbildung 22: Coomassie-SDS-Gel mit aufgetrennter *E. coli*-Membranfraktion (MF). Es existiert keine distinkte Bande bei 32 kDa, welche dem *ubiA*-Molekulargewicht entspräche. Ein tryptischer Verdau mit anschließender MALDI-MS-Analyse der markierten Banden ergab folgende Membranproteine:

- (1) – Äußeres Membranprotein A
- (2) – Äußeres Membran-Prion
- (3) – Translations/Elongationsfaktor
- (4) – Lambda-Rezeptor-Protein

Eine Gelelektrophorese der aktiven angereicherten Membranfraktion über ein SDS-Polyacrylamidgel und eine anschließende Anfärbung mit Coomassie oder Silber zeigt zwar eine charakteristische Auftrennung verschiedener Proteine, aber keine distinkte Proteinbande bei ca. 32 kDa (theoretische Größe des *ubiA*-Genprodukts). Nach einer Extraktion von Proteinen aus dem SDS-Gel (zwischen ~22 und ~38 kDa) mit darauf folgendem tryptischen Verdau erfolgte, mit freundlicher Unterstützung von A. Schierhorn eine MS-Analyse (MALDI-MS) [100]. Dabei konnte die Anwesenheit der aromatischen Prenyltransferase eindeutig ausgeschlossen werden. In Abbildung 22 ist ein Ausschnitt aus dem Coomassie-SDS-Gel mit den untersuchten Proteinbanden und deren Zuordnung nach

Datenbankabgleich (MASCOT – www.matrixscience.com) der tryptischen Fragmente dargestellt.

Die erfolgreiche Expression von Enzymen kann zusätzlich mit spezifischen Antikörpern mittels Western-Blot (Immunblot) nachgewiesen werden. Außerdem wären dadurch auch Aussagen über ein eventuelles unspezifisches Laufverhalten auf einem SDS-Gel möglich. Die Voraussetzung für einen derartigen immunologischen Assay ist die Markierung des entsprechenden Proteins mit einem Antigen, welche häufig am C-Terminus erfolgt. In der hier vorliegenden Arbeit wurde mit den entsprechenden Primern (Kapitel 2.2.4. *ubiA*) ein C-terminaler Hexahistidylrest in den ORF des *ubiA*-Enzyms integriert. Da *ubiC* als natürlicher Promotor [33] die Expression der aromatischen Prenyltransferase verstärkt, wurde sowohl ein *ubiA*-, als auch ein *ubiCA*-Konstrukt histidyliert. Nach Ligation der beiden Gene in pET101/D-TOPO und Transformation in *E. coli* DH10B erfolgte eine Verifizierung mittels

Dye-Terminations-Sequenzierung, welche einen fehlerfreien ORF für ubiA-6xhis bestätigte. Die Verifizierung der Sequenz von ubiCA-6xhis war auch nach mehrmaliger Sequenzierung (unter anderem auch durch MWG) und wiederholte Ligation/Transformation nicht möglich. Dennoch weist das Produkt der Kolonie-PCR mit den transfizierten ubiCA-6xhis DH10B-Zellen auf eine erfolgreiche Insertion des Hexahistidylrestes für dieses Konstrukt hin. Nach Expression beider Gene in *E.coli* DH10B und Zellaufschluss erfolgte eine Anreicherung der entsprechenden Membranfraktion durch Ultrazentrifugation. Die Auftrennung mit einem SDS-Polyacrylamidgelele und anschließender immunologischer Markierung mittels Rettich-Peroxidase-konjugierten Antikörpern zeigte ein uncharakteristisches und diffuses Laufverhalten der histidylierten Proteine. Weder durch unterschiedlich konzentrierte SDS-Polyacrylamidgelele, noch durch zusätzliche Ultraschallbehandlungen oder längere Denaturierungsschritte (96 °C oder Harnstoff) konnte das Laufverhalten markant verbessert werden. Die spezifische Markierung mit Antikörpern (unter Verwendung von Positiv- und Negativkontrolle) deutete auf eine positive Expression beider Konstrukte, obgleich keine Aktivität bezüglich GBA-Bildung oder GPP-Hydrolyse zu verzeichnen war. Es muss also davon ausgegangen werden, dass eine Auftrennung des ubiA-Genproduktes über ein „herkömmliches“ SDS-Gel nicht möglich ist. Eine Ursache dafür kann eine sehr starke Assoziation zur biologischen Membran darstellen, durch welche eine molekulargewichtsspezifische Elektrophorese erschwert wird.

3.1.8. Zusammenfassende Diskussion - Prenyltransferasen

Mittels Homologie Modelling konnte auf Basis des Photosynthesereaktionszentrums von *R. viridis* ein erstes dreidimensionales Model des ubiA-Enzyms aus *E. coli* entwickelt werden, welches aufgrund seiner sehr geringen Sequenzidentität als grobe Approximation an die tatsächliche Struktur angesehen werden sollte. Dennoch kann dieses Modell helfen prinzipielle Mechanismen der Substraterkennung und der Katalyse zu verstehen. Multiple Alignments zeigten, dass zwei mögliche aktive Zentren betrachtet werden müssen, welche sequenziell weit voneinander entfernt sind. Das zweite zusätzliche aktive Zentrum, welches als sekundäre Phosphatbindungsregion von kettenverlängernden Prenyldiphosphat-Synthasen bekannt ist, deutet auf den gemeinsamen evolutionären Ursprung der aromatischen Prenyltransferasen hin [29]. Die Ergebnisse der durchgeführten und in Kapitel 3.1.6. beschriebenen Mutationsexperimente sind nicht nur ein direkter Beweis für die Existenz von zwei aktiven Zentren, sondern zeigen vielmehr die Notwendigkeit von deren räumlicher

Verknüpfung zueinander auf. Parallel vorgenommene Alanin-Austausche der gleichen Aminosäurereste eines entsprechenden Enzyms in *Lithospermum erythrorhizon* führten zu identischen Resultaten (persönliche Kommunikation – K. Yazaki, Kyoto, Japan) [101]. Legt man das entwickelte Strukturmodell des ubiA-Enzyms zugrunde, bedarf dieses einer umfangreichen Korrektur, zumindest in Hinsicht auf die Positionierung der beiden aktiven Zentren (vergleiche Abbildung 9). Daher sollten verbesserte, auf anderen Template-Strukturen basierende Modelle erzeugt werden. Durch ein spezielles Verfahren zum Alignment von Sekundärstrukturelementen konnten vier Proteinstrukturen ermittelt werden, welche als Modellierungsgrundlage in Betracht kommen (persönliche Kommunikation – W. Brandt, IPB-Halle) [102]. Diese zeichnen sich durch Identitäten von bis zu 24,5% zum ubiA-Enzym aus. Anhand der identifizierten Röntgenkristallstrukturen wurden letztendlich neue Homologie-Modelle generiert. Dennoch war es auch damit nicht möglich eine räumliche Verknüpfung der beiden diskutierten aktiven Zentren zu realisieren und dementsprechend die Ergebnisse der Mutationsexperimente zu erklären. Aus diesem Grund wird in der vorliegenden Arbeit auch nicht weiter auf die neu generierten Homologie-Modelle eingegangen.

Mit der Transmembran-Helix-Vorhersage TMHMM, welche über ein Hidden-Markov-Modell mit hoher Wahrscheinlichkeit Aussagen über die Orientierung von Transmembranhelices erlaubt, konnte letztendlich ein rudimentäres Schema zum Verständnis der enzymatischen Aktivität (vermittelt durch beide aktive Zentren) entwickelt werden.

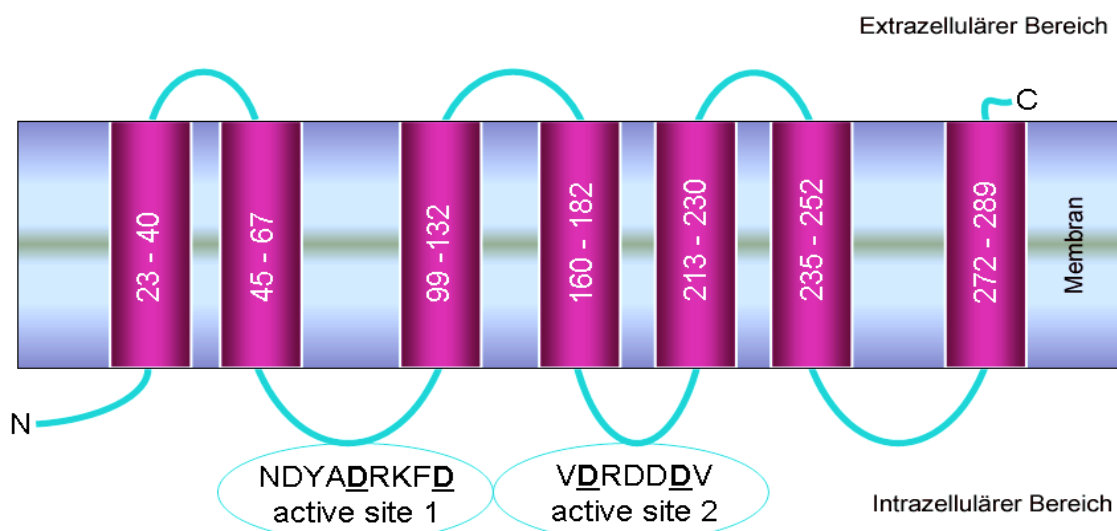


Abbildung 23: Revidiertes schematisches Modell des ubiA-Enzyms, welches mittels TMHMM erstellt werden konnte. Dieses Schema zeigt die Existenz von sieben Transmembranhelices, durch welche beide aktiven Zentren direkt benachbart, auf der gleichen Seite der Membran orientiert sind. Magentafarben sind α -Transmembranhelices dargestellt, Extra- und Intrazelluläre Loops sind cyan wiedergegeben.

Abbildung 23 zeigt das mit Hilfe von TMHMM erstellte Modell, welches bedingt durch die Lokalisation der aktiven Zentren die Resultate der Mutationsexperimente, zumindest teilweise erklärt. In Hinsicht auf den starken, aber nicht völligen Aktivitätsverlust nach Mutation von R137A ist auch mit diesem Modell noch keine definitive Aussage möglich. Es kann aber angenommen werden, dass durch den Austausch zu Alanin zwar eine charakteristische Funktion zur Stabilisierung des Aromaten entfernt wurde, ein Binden der *para*-Hydroxybenzoesäure aber dennoch möglich ist. Dieses kann weiterhin über die Wasserstoffbrückenbindung zwischen der phenolischen Gruppe und D71, bzw. D191 erfolgen. Eine partielle Fehlfaltung des Enzyms durch die Eliminierung der charakteristischen Guanidinogruppe ist aber nicht völlig auszuschließen. Eventuell könnte eine R137L-Mutation den möglichen katalytischen Einfluss des Arginins erklären, da ein Austausch gegen Lysin bezüglich Volumen und Partialladung nicht so beträchtlich wäre. Weiterhin wurde die Hydrolaseaktivität des ubiA-Enzyms, auch in Hinsicht auf die mutagenisierten Varianten bestätigt, was als weiteres wichtiges Indiz auf die Existenz von zwei kombinierten aktiven Zentren angesehen werden kann. Zusätzlich konnte dadurch eine Fehlfaltung des ubiA-Enzyms, zumindest teilweise ausgeschlossen werden.

Weder mittels Coomassie-Färbung, noch durch immunochemische Nachweismethoden war eine eindeutige Identifizierung des ubiA-Enzyms möglich. Es ist zu vermuten, dass dieses eine zu starke Assoziation zu biologischen Membranen besitzt und demnach nicht vollständig zu separieren ist.

Ungeachtet der Unsicherheiten des Strukturmodells wurden mit quantenmechanischen Methoden verschiedene Aspekte der Katalyse beleuchtet, welche darüber hinaus zeigen, dass der enzymatische Prozess thermodynamisch begünstigt ist und der Reaktionsverlauf tendenziell nach dem Typ eines S_N1 -Mechanismus abläuft. Dabei konnte mit Hilfe der Berechnungen in Kapitel 3.1.5. die durch Wessjohann et al. beschriebene Substratspezifität des ubiA-Enzyms interpretiert und sowohl thermodynamisch, als auch kinetisch erklärt werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass durch Kombination verschiedener Methoden des Molecular Modelling, auch mit sehr geringen Sequenzidentitäten relativ zuverlässige Strukturmodelle erstellt werden können – zumindest in Hinsicht auf die Anordnung der Aminosäuren in den aktiven Zentren.

Die hier erörterten Ergebnisse tragen somit nicht nur zum Verständnis der Prinzipien des Katalysemechanismus bei, sondern können bei der Entwicklung neuer Liganden oder Inhibitoren für dieses Enzym hilfreich sein.

3.2. Zwei Terpensynthesen aus *Cannabis sativa*

3.2.1. (-)-Limonen- und (+)- α -Pinen-Synthase

Kaum eine zweite Pflanze gibt mehr Anlass zu kontroversen Diskussionen in der Gesellschaft, als der indische Hanf, oder auch *Cannabis sativa*. Dabei ist der Nutzen dieser einjährigen Pflanze mit ihren typisch handförmig gelappten Blättern völlig unstrittig. Cannabis, welcher bis zu 400 cm hoch wachsen kann, findet Verwendung als Faserpflanze, zur Gewinnung von Hanföl, als Naturheilprodukt, oder als Rauschmittel. Unter dieser Betrachtungsweise ist es nicht verwunderlich, dass Hanf ein begehrtes Untersuchungsobjekt für Chemiker, Pharmakologen oder Biologen geworden ist. Umfangreiche Forschungsarbeiten beziehen sich auf den Sekundärstoffwechsel, der sowohl männlichen, als auch weiblichen Pflanze, deren Gehalt am so genannten Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (THC) 8% und mehr betragen kann [103]. Doch nicht nur THC, sondern zahlreiche andere Inhaltsstoffe z.B. ätherische Öle, sind von großem Interesse für Biotechnologie, Medizin und Chemische Industrie. Unter ihnen sind die Produkte des Sekundärstoffwechsels, Limonen und Pinen, welchen als Ausgangsverbindung Geranyldiphosphat gemein ist. In der von Croteau et al. postulierten Zyklisierungsreaktion (siehe Abbildung 5, Kapitel 1.4.2.) werden die entsprechenden Monoterpene durch spezifische Enzyme gebildet. Die zwei entsprechenden Proteine, welche die Umsetzung von Geranyldiphosphat hauptsächlich zu (-)-Limonen bzw. zu (+)- α -Pinen katalysieren, zeigen eine 65%ige Sequenzidentität zueinander auf.

Derzeit sind verhältnismäßig wenige Informationen über beide Terpensynthesen verfügbar. Erste Analysen in Form einer Diplomarbeit wurden durch N. Günnewich vorgenommen [53]. Dabei konnten aus glandulären Trichomzellen von *C. sativa* über eine cDNA-Bank die entsprechenden Gene isoliert, und in den Expressionsvektor pET101 kloniert werden. Erschwerend auf die spätere Expression und die native Faltung der Enzyme wirkt sich auch das N-terminale Chloroplasten-Transit-Peptid aus. Dieses konnte aber mittels Oligonukleotidanlagerung aus beiden Genen entfernt werden. Letztlich resultierten zwei ORF's ohne die beschriebene Erkennungsregion, welche nach Expression und Enzymassay (-)-Limonen (CsTps1) bzw. (+)- α -Pinen (CsTps2) als Hauptprodukte ergaben.

Zum Verständnis der Struktur des aktiven Zentrums und damit auch der ablaufenden Enzymreaktionen kann nicht in jedem Fall auf den reichhaltigen Fundus an dreidimensionalen

Strukturen in der Protein Data Bank (PDB) zurückgegriffen werden. Auch für die hier untersuchten Terpensynthasen liegen keine Strukturinformationen vor und die Erstellung eines Computermodells sollte Aussagen über die Produktspezifität der Enzyme erlauben. Aus Similaritätssuchen in der Protein Data Bank mit 3d-pssm und BLAST resultierten zwei Enzymstrukturen, welche als Basis für Homologie Modelle in Frage kommen. Die Namen und die biologische Herkunft, sowie die Identitäten und Kettenlängen der gefundenen Strukturen sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Sequenzidentitäten und E-Werte - Cannabis sativa Terpensynthase

PDB-Struktur	CsTps1	E-Wert	CsTps2	E-Wert
	623 Aminosäuren		616 Aminosäuren	
5-Epi-Aristolochene Synthase* (<i>Nicotiana tabacum</i>) PDB: 5EAS 514 Aminosäuren	36%	0.139	35%	0.139
(+)-Bornyldiphosphat Synthase ** (<i>Salvia officinalis</i>) PDB: 1N24 532 Aminosäuren	46%	6.14 ⁻⁰⁶	44%	6.14 ⁻⁰⁶

Mit BLAST und 3d-pssm ermittelte Proteinstrukturen, welche aufgrund ihrer Identität as Template für Homologie Modelle in Frage kommen. Es sind sowohl die Länge der Templates, als auch die Identitäten gegenüber den Zielproteinen dargestellt. *[104]; ** [105]

Dabei bildete die 2002 veröffentlichte Struktur der (+)-Bornyldiphosphat-Synthase aus *Salvia officinalis* aufgrund ihrer hohen Identität von über 44% und des deutlich besseren E-Wertes die beste Grundlage zur Modellentwicklung. Die Tatsache dass dieses Enzym ausgehend von Geranyldiphosphat eine den beiden zu untersuchenden Terpensynthasen ähnliche Zyklisierungsreaktion katalysiert, macht sie zu einem hervorragenden Template für die Homologie-Modellierung. Zusätzlich konnten mittels 3d-pssm weitere Proteine identifiziert werden. Diese zeichnen sich aber durch deutlich geringere Identitäten zu den beiden Terpensynthasen aus (beispielsweise Farnesyldiphosphat-Synthase – 9%).

3.2.2. Das Modellierungstemplate

Salvia officinalis ist eine mehrjährige, zur Familie der *Lamiaceae* (Lippenblütler) gehörende Pflanze, welche in den westlichen Regionen des Mittelmeers beheimatet ist. Bereits im Mittelalter wurde Salbei, so der deutsche Name, wegen seiner antibakteriellen und antiinflammatorischen Eigenschaften geschätzt und medizinisch eingesetzt. Der durch Destillation gewonnene ätherische Extrakt enthält neben Thujon (Hauptbestandteil) auch die Monoterpenoide Camphen, Pinen und Borneol. Der Bornylalkohol welcher auch durch

Hydrolyse von Bornyldiphosphat unter Abspaltung von Diphosphat gewonnen werden kann, stellt das Hauptprodukt der (+)-Bornyldiphosphat-Synthase dar, welche das Fundament für eine Modellierung der beiden Terpensynthasen bildet. Croteau und seinen Mitarbeitern war es möglich, die dreidimensionale Struktur der metallionen abhängigen Monoterpen-Synthase mit Hilfe von röntgenkristallographischen Untersuchungen bei einer Auflösung von 2,0 Å aufzuklären. Jedes Monomer des dimeren Proteins beinhaltet zwei α -helikale Domänen. Während die C-terminale Region des Enzyms maßgeblich an der eigentlichen Zyklisierungsreaktion von Geranyldiphosphat beteiligt ist, kann der N-terminalen Domäne noch keine klare Funktion zugeordnet werden, obgleich diese das aktive Zentrum umschließt. (Die C-terminale Domäne enthält 12 α -Helices, von denen 6 an der Ausbildung des katalytisch aktiven Zentrums beteiligt sind.)

Auch (+)-Bornyldiphosphat-Synthase beinhaltet das, unter den „prenylierenden Enzymen“ weit verbreitete N/DDxxD – Motiv, wobei D351 und D355 an der Komplexierung eines benötigten, zweiwertigen Metallions beteiligt sind. Ein weiteres Magnesiumion ist über Asp496 gebunden und trägt dementsprechend mit zur Orientierung des Geranyldiphosphats im aktiven Zentrum bei. Mit Hilfe von Substratanalogen (3-Aza-2,3-dihydrogeranyldiphosphat; 7-Aza-7,8-dihydrolimonen; 2-Azabornan), welche im Enzym gebunden werden, aber nicht zum entsprechenden Produkt reagieren, konnten durch Whittington et al. Aussagen über einen möglichen Zyklisierungsmechanismus getroffen werden [105]. Die putative Reaktion zum Terpinyl-Kation wurde bereits in Kapitel 1.4.2. diskutiert. Es kann weiterhin davon ausgegangen werden, dass die räumliche Anordnung des aktiven Zentrums, vor allem durch seine Flexibilität, zur Ausbildung der bevorzugten Konformation des Terpens führt. Das Diphosphat hingegen verbleibt nahezu starr in seiner verankerten Position, welche durch die Magnesiumionen vermittelt wird. Daher ist gewährleistet, dass nach der Zyklisierung des Geranylrestes zum Bornyl-Kation das Diphosphat (welches üblicherweise eine gute Abgangsgruppe darstellt) wieder addiert werden und sich das Endprodukt (+)-Bornyldiphosphat bilden kann.

3.2.3. Homologie Modelling und Strukturverfeinerung

Um Einblicke in die möglichen aktiven Zentren der (-)-Limonen-Synthase (LS) und Pinen-Synthase (PS) aus *Cannabis sativa* zu erlangen und damit Rückschlüsse auf die bereits angesprochene Produktspezifität ziehen zu können, wurde unter Verwendung des oben beschriebenen Modellierungs-Templates ein Homologie Modell für beide Enzyme erstellt. Im

Folgenden soll noch einmal kurz die Vorgehensweise bei der Modellierung beschrieben werden, welche aber prinzipiell nach dem gleichen Prinzip erfolgt, wie in 3.1.1. und 3.1.2. geschildert.

Um eine Vorstellung über die Faltung, zumindest auf Sekundärstrukturebene zu erlangen, sollte idealerweise eine Sekundärstrukturvorhersage erfolgen. Moderne Sekundärstrukturvorhersagen liefern Ergebnisse mit einer Zuverlässigkeit von über 80%. In Abbildung 24 ist ein Sequenzalignment (BLOSUM45) der beiden Terpensynthasen mit dem Modellierungstemplate ((+)-Bornyldiphosphat-Synthase) und eine entsprechend vorhergesagte Sekundärstruktur dargestellt. Dabei ist die sehr hohe Übereinstimmung auf Sekundärstrukturebene erkennbar. Die Vorhersage erfolgte in diesem Fall mit der Internetbasierten Methode 3d-pssm. Darüber hinaus existieren selbstverständlich weitere Routinen um eine relativ zuverlässige Information über die Sekundärstruktur eines Proteins zu erhalten, welche sich in ihrer Aussagekraft aber nur sehr gering unterscheiden. Anhand des Alignments kann ebenso die bereits häufig diskutierte Magnesium- und Diphosphatbindungsstelle mit dem Motiv N/DDxxD identifiziert werden.

Über die Sekundärstrukturvorhersage lässt sich bereits leicht ableiten, dass sowohl die (-)-Limonen-Synthase, als auch die (+)- α -Pinen-Synthase zu einem überwiegenden Teil aus sich abwechselnden und durch Coil-Bereiche verbundene α -helikalen Regionen aufgebaut ist. β -Faltblattelemente sind für beide Enzyme nur in sehr geringem Maß vorhergesagt. Allein mit Hilfe der Sekundärstrukturvorhersage kann jedoch noch nicht ermessen werden, wie die räumliche Anordnung der einzelnen Strukturelemente zueinander und damit die Ausbildung möglicher aktiver Zentren ist. Die zelluläre Lokalisation und damit Faltung eines Proteins ist direkt durch die Orientierung seiner hydrophoben oder hydrophilen Aminosäuren widerspiegelt. Das soll heißen, dass beispielsweise ein cytosolisches Enzym noch während seiner Expression einer Art „hydrophobem Kollaps“ unterliegt und seine hydrophilen Aminosäuren nach physikochemischen Gesichtspunkten dem Lösungsmittel zugewandt sind. Die Eigenschaft der Hydrophobizität eines Proteins lässt sich theoretisch über den Koeffizienten $\log P$ bestimmen, welcher für lösliche Enzyme negative Werte annimmt. Beide Terpensynthasen sind nachweislich cytosolische Enzyme und sowohl das Template, als auch die entwickelten Homologie-Modelle sind durch negative $\log P$ ausgezeichnet, welche zusätzlich in Tabelle 9 aufgeführt werden.

		* * * * *		***	* * *	* * *	
Template;	...EAHQIR	RSGNYQPALW	DSNYIQSLNT	PYTEERHLDR	KAELIVQVRI		95
Limonen-Synthase;	SSTITNNSDR	RSANYGPIIW	SFDFVQSLPI	QYKGESYTSR	LNKLEKDVKR		118
Pinen-Synthase;	.SSDTSTIVR	RSANYDPPIW	SFDFIQSLPC	KYKGEPTYTSR	SNKLKEEVKK		112
		*	*****	** * *	* * **		
Template;	LLKEKMEPVQ	QLELIHDLKY	LGLSDFEQDE	IKEILGVIYN	EHKCFHNNEV		145
Limonen-Synthase;	MLIGVENSLA	QLELIDTIQR	LGISYRFENE	IISILKEKFT	NNN...DNPN		165
Pinen-Synthase;	MLVGMENSLV	QLELIDTLQR	LGISYHFENE	IISILKEYFT	NIS...TNKN		159
		*** **	***** *	* ** *	*	***	
Template;	EKMDLYFTAL	GFRLLRQHGf	NISQDVFNCF	KNEKGIDFKA	SLAQD.TKGM		194
Limonen-Synthase;	PNYDLYATAL	QFRLLRQYGF	EVPQEIFNNF	KNHKTGEFKA	NISND.IMGA		214
Pinen-Synthase;	PKYDLYATAL	EFRLREYGY	AIPQEIFNDF	KD.ETGKFKA	SIKNDIDIKV		208
		* *****	** * *	* * *			
Template;	LQLYEASFLl	RKGEDTLELA	REFATKCLQK	. .KLDEGGNE	IDENLLLWIR		242
Limonen-Synthase;	LGLYEASFHG	KKGESILEEA	RIFTTKCLKK	YKLMSSSNNN	NMTLISLLVN		264
Pinen-Synthase;	LALYEASFYV	KNGENILEEA	RVFTTEYLKR	YVMMIDQNI	LNDNMAILVR		258
		* * * * *	** * **	*	* * * **	* * *	
Template;	HSLDPLHWR	IQSVEARWFI	DA.YARRPDM	NPLIFELAKL	NFNIIQATHQ		291
Limonen-Synthase;	HALEMPQWR	ITRSEAKWFI	EIYERKQDM	NPTLLEFAKL	DFNMLQSTYQ		314
Pinen-Synthase;	HALEMPHWR	TIRAEAKWFI	EE.YEKTQDK	NGTLEFAKL	DFNMLQSTFQ		307
		** *****	*	*****	* * *	*	
Template;	QELKDLRWW	SRLCFPE.KL	PFVRDLVES	FFWAVGMFEP	HQHGyQRKMA		340
Limonen-Synthase;	EELKVLRRWW	KDSKLGE.KL	PFVRDLVEC	FLWQVGVRF	PQFSYFRIMD		363
Pinen-Synthase;	EDLKHVSRWW	EHSKLGKNKM	VYARDRLVEA	FLWQVGIRFE	PQFSHFRRIS		357
		* * * **	****	** * **	***	** * **	
Template;	ATIIVLATVI	<u>DDIYD</u> VYGTl	DELELFTDTF	KRWDTESITR	LPYYMQLCYW		390
Limonen-Synthase;	TKLYVLLTII	<u>DDMHD</u> VYGTl	EELQLFTNAL	QRWDLKELDK	LPDYMKTAFY		413
Pinen-Synthase;	ARIYALITII	<u>DDIYD</u> VYGTl	EELFTKAV	ERWDAKTIHE	LPDYMKLFFF		407
		* * * * *		*	* * * **		
Template;	GVHNYISDAA	YDILKEHGFF	CLOYLRKSVV	DLVEAYFHEA	KWYHSGYTPS		440
Limonen-Synthase;	FTYNFTNELA	FDVLQEHGFV	HIEYFKLMV	ELCKHHLQEA	KWFYSGYKPT		463
Pinen-Synthase;	TLFNTVNEMA	YDVLEEHNfV	TVEYLKNSWA	ELCRCYLEEA	KWFYSGYKPT		457
		* * *	* * *	*			
Template;	LDEYLNIAKI	SVASPAIISP	TYFTFANASH	DTAVIDSLYQ	YHDILCLAGI		490
Limonen-Synthase;	LQEYVENGWL	SVGGQVILMH	AYFAFTNPVT	KEALECLKDG	HPNIVRHASI		513
Pinen-Synthase;	LKKYIENASL	SIGGQIIFFVY	AFSLSLTKSIT	NEALESLQEG	HHAACRQGS		507
		*** *****	** *****	** *****	* * * * *	* * * * *	
Template;	ILRLPDDLGT	SYFELARGDV	PKTIQCYMKE	TNASEEEAVE	HVKFLIREAW		540
Limonen-Synthase;	ILRLADDLGT	LSDELKRGDV	PKSIQCYMHD	TGASEDEARE	HIKYLISESW		563
Pinen-Synthase;	MLRLADDLGT	SDELKRGDV	PKSVQCYMHE	TGVSEDEARE	HIKFLISEIW		557
		* **	*	**	* * **		
Template;	KDMNTAI.AA	GYPFPDGMVA	GAANIGRVAQ	FIYHLGDGFG	VQHSKTYEHI		589
Limonen-Synthase;	KEMNEDGNI	NSFFSNEFVQ	VCQNLGRASQ	FIYQYGDGHA	SQNNLSKERV		613
Pinen-Synthase;	KEMNDED.EY	NSIFSKEFVQ	ACKNLGRMSL	FMYQHGdGHA	SQDShSRKRI		606
		*					
Template;	AGLLFEPYA.						598
Limonen-Synthase;	LGLIITPIPM						623
Pinen-Synthase;	SDLIINPIPL						616

Abbildung 24: Sequenzalignment (BLOSUM45) und Sekundärstrukturvorhersage mit 3d-pssm (Chloroplasten-Transit-Peptide sind entfernt) - α -Helikale Regionen in der Aminosäuresequenz sind einfach unterstrichen, wohingegen β -Faltblattstrukturen durch eine gestrichelte Linie dargestellt sind. Nicht unterstrichene Aminosäurereste entsprechen Coil-Bereichen. Das diphosphat- und metallionenkoordinierende Motiv ist eingerahmt. *Identische Aminosäurereste sind durch Sterne gekennzeichnet

Mit dem Programmpaket MOE konnten, nach einem Alignment der Sequenzen mit BLOSUM45, unabhängige Modelle für CsTps1 und CsTps2 erstellt werden. Diese wurden in Hinsicht auf mögliche Wasserstoffbrückenbindungen und Orientierung von Aminosäureseitenketten optimiert (CHARMM22). Die resultierenden Strukturen sind überlagert in Abbildung 25 dargestellt und zeigen, abgesehen von minimalen Unterschieden in verschiedenen Coil-Bereichen, sehr hohe Übereinstimmung bezüglich ihrer Tertiärstruktur. Auch die modulare Zusammensetzung wie im Template ist zu erkennen. Zugunsten der Übersichtlichkeit wurde hier die nicht aktive N-terminale Domäne nur schematisch abgebildet. In Abbildung 35 (Anhang) sind beide Modelle nochmals komplett als Stereoabbildung dargestellt.

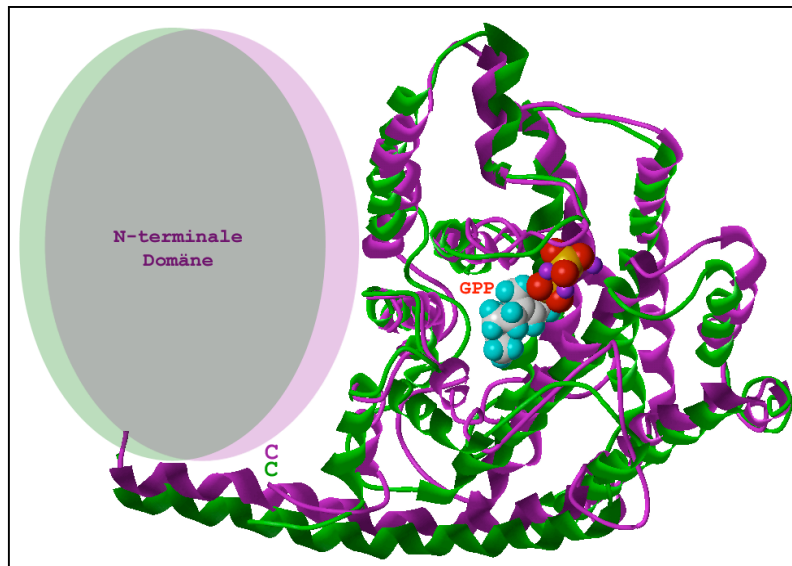


Abbildung 25: Überlagerte, resultierende Modelle der (-)-Limonen-Synthase (magenta) und der Pinen-Synthase (grün). Das gebundene Substrat GPP zeigt die Lokalisation des aktiven Zentrums in der katalytisch aktiven C-Domäne. Die N-terminale Domäne ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nur schematisch dargestellt.

Die Qualität in Hinsicht auf sterische Restriktionen für Torsionswinkel und Seitenketten mit dem Programm PROCHECK zeigte eine sehr gute Qualität bei einer theoretischen Auflösung von 2,0 Å. Dabei sind für CsTps1 88,5% der Torsionswinkel in den am meisten bevorzugten Regionen und 11,5% in den extra erlaubten Bereichen lokalisiert. Die Werte für CsTps2 sind vergleichbar –

87,4% in den am meisten bevorzugten und 12,6% in den zusätzlich erlaubten Bereichen. Alle Anforderungen an ein „gutes“ Modell wie beispielsweise die Planarität der Peptidbindung, Bindungslängen und -winkel etc. sind innerhalb der zulässigen Parameter oder sogar besser. Eine zusätzliche Verbesserung der Qualität war lediglich für einen kleinen Sequenzbereich der CsTps2 nötig. Hierzu konnte durch eine 5000 fs Moleküldynamik Simulation bei 250 K mit dem Amber-Kraftfeld eine stabilere Konformation für einen Coil-Bereich (AS 167-180) im nicht aktiven N-Terminus von CsTps2 erzielt werden.

Die mit ProsaII errechneten Potentiale der mittleren Energie indizieren für beide Modelle eine mögliche native Faltung. Der Z-Wert, welcher mit diesem Programm kalkuliert werden kann,

ist ein theoretisches Maß für die Qualität einer Protein-Struktur. Er wurde an mehreren Kristallstrukturen bekannter Proteine trainiert und hängt direkt von der Länge der Sequenz ab. Die berechneten Potentiale und Z-Werte können zur Verifizierung der entwickelten Modelle mit denen des Templates verglichen werden. In Tabelle 9 sind die berechneten Z-Werte gegenübergestellt. Abgesehen von sehr geringen Abweichungen in CsTps2, ähneln sich alle PROSII-Potentiale den Werten des Template-Proteins.

Tabelle 9: ProsaII- und logP-Werte für die modellierten Terpensynthasen und das Template

Struktur	Z-Paar (α/β)	Z-Oberfläche	Z-Kombiniert	logP _{calc}
Template	-9.48	-9.31	-13.17	-262,4
CsTps1	-9.16	-9.48	-12.87	-309,6
CsTps2	-7.07	-7.63	-10.30	-312,2

Zusätzlich ist in Abbildung 26 eine graphische Darstellung der Energie in Abhängigkeit von der Sequenz dargestellt. Auch hier sind einige Unterschiede zwischen den einzelnen Strukturen erkennbar, obgleich das Modell CsTps1 (magenta) in einem großen Bereich (AS 300-500) eine bessere Qualität in Hinsicht auf das Energiepotential aufzeigt, als die Template-Struktur (rot). Das Modell CsTps2 (grün) zeichnet sich durch größere Abweichungen im N-terminalen Bereich aus, welche aber dennoch durch ein negatives Potential ausgezeichnet sind. Es ist also davon auszugehen, dass das Modell der CsTps2 bezüglich seiner N-terminalen Region noch nicht optimal gefaltet ist. In der katalytisch aktiven C-terminalen Domäne zeigen beide Modelle jedoch eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Template.

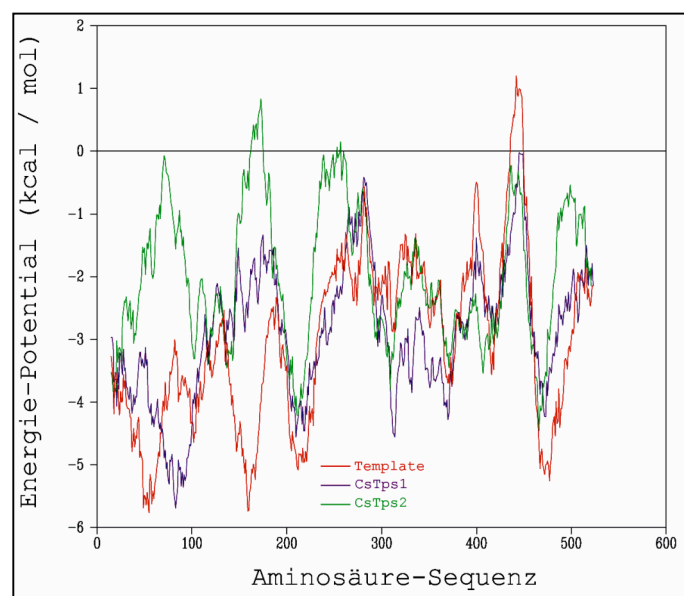


Abbildung 26: ProsaII – Oberflächenpotential der beiden Modelle (magenta – (-)-Limonen-Synthase; grün – (+)- α -Pinen-Synthase) im Vergleich zum Template (rot).

Die berechneten Werte sind nicht als absolut anzusehen, da jedes Protein einer bestimmten Dynamik unterliegt, und Coil/Loop-Bereiche diesbezüglich besonders flexibel sind.

3.2.4. Das aktive Zentrum

Aus eigenen Untersuchungen ist die Notwendigkeit von Mg^{2+} -Ionen für die Biokatalyse bekannt. Diese kann aber auch anhand der Röntgenkristallstruktur der (+)-Bornyldiphosphat-Synthase, bei welcher eine Komplexierung über drei Magnesiumionen stattfindet, abgeschätzt werden. Wie hoch die Anzahl der Magnesiumionen in den beiden Terpensynthasen tatsächlich ist, kann vermutlich nur über eine Kristallstrukturanalyse ermittelt werden. Über die zahlreichen konservierten Aspartate könnte man aber erwarten, dass mehr als ein Mg^{2+} -ion an der Bindung des Prenyldiphosphats beteiligt ist. Mit dem Wissen über das N/DDxxD-Motiv und durch Vergleiche mit der Kristallstruktur kann das mögliche aktive Zentrum der beiden Modelle verhältnismäßig sicher identifiziert werden (siehe Abbildung 25). Dieses liegt, abgeschirmt durch zwei Coil-Bereiche (CsTps1: Y₅₉₆ – N₆₀₆ und S₅₂₅ – K₅₃₅; CsTps2: L₅₂₂ – K₅₂₉; Y₅₈₉ – S₆₀₂) relativ zentral in der katalytisch aktiven C-terminalen Domäne. Mit dem automatisierten Dockingprogramm GOLD sollte nun eine mögliche Konformation des Geranyldiphosphats für beide Modelle berechnet werden, welche über die postulierte Zyklisierungsreaktion zum entsprechenden Monoterpen führen kann. Dabei wurde zur Validierung des genetischen Dockingalgorithmus auch (+)-Bornyldiphosphat gedockt, dessen Geometrie und Orientierung aus der Kristallstruktur bekannt ist. Letztere konnte mit GOLD problemlos reproduziert werden. Aus multiplen Versuchen (30 Dockingiterationen), das Substrat Geranyldiphosphat in die Bindungstasche des Enzyms zu docken, resultierten nur zwei in Betracht kommende Ligandengeometrien, welche eine Zyklisierung erlauben würden und annähernd der Orientierung des Produktes entsprechen.

Ungleich kritischer sind die Resultate der Dockinganalysen bezüglich der modellierten Strukturen zu interpretieren. Für das Modell der (-)-Limonen-Synthase erfolgte die Ausrichtung des Geranyldiphosphats zwar korrekt in die putative Bindungstasche, aber es resultierte keine Ligandenkonformation, welche ohne weitere Faltung des Substrats zur Zyklisierung und damit zum erwarteten Produkt führen könnte. Für die (+)- α -Pinen-Synthase resultierte keine angemessene Ligandenausrichtung. In Anbetracht eines *induced fit* [106] muss aber ohnehin davon ausgegangen werden, dass sich sowohl die Proteinstruktur, als auch die Konformation des Geranyldiphosphats während der Erkennung und auch der Reaktion verändern. Ähnliche Prozesse der „Faltungshilfe“ sind nicht nur für (+)-Bornyldiphosphat Synthase, sondern beispielsweise auch für eine Shikimat-Kinase oder DNA-bindende Proteine beschrieben [107;108]. Zur Simulation nativer Bedingungen und zur Neuorientierung des Liganden sollte eine Moleküldynamik Simulation beitragen. Dazu wurden alle

Proteinbestandteile, ausgenommen die Aminosäuren des aktiven Zentrums und die Liganden (GPP, Magnesium), fixiert und bei 300 K einer 10.000 fs Moleküldynamik mit dem Tripos-Kraftfeld unterzogen. Das Resultat ist in einem strukturellen Alignment in Abbildung 27 dargestellt. Außerdem sind die beiden resultierenden Modelle mit ihrem Template überlagert um die sequenziellen Ähnlichkeiten zu veranschaulichen. Eine Stereoabbildung der strukturellen Überlagerung ist Abbildung 36 (Anhang) dargestellt.

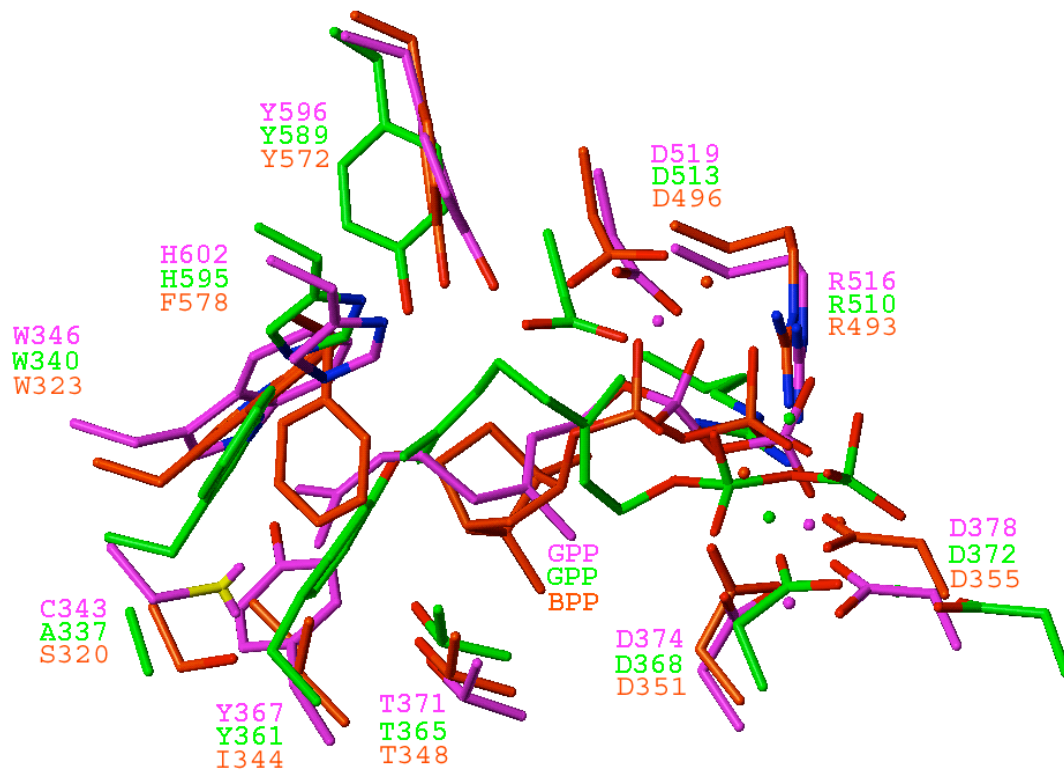


Abbildung 27: Überlagerte Aminosäurereste in den möglichen aktiven Zentren von CsTps1 (magenta) und CsTps2 (grün), sowie dem aktiven Zentrum der Kristallstruktur von (+)-Bornyldiphosphat-Synthase (rot-orange). Als Liganden sind Geranyldiphosphat, respektive (+)-Bornyldiphosphat dargestellt. Nicht essentielle Wasserstoffe sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet.

Die Komplexierung des Geranyldiphosphats über Magnesiumionen erfolgt in allen drei Strukturen über Aspartat (N/DDxxD-Motiv) und zusätzlich über konserviertes Arginin (Template: R493; CsTps1: R516; CsTps2: R510) und Aspartat (Template: D496; CsTps1: D519; CsTps2: D513). Eine Stabilisierung des unpolaren Geranylrestes ist in den Terpenzyklasen über das π -Elektronen-System von Tryptophan (CsTps1: W346; CsTps2: W340) gewährleistet. Da beide Modelle strukturell nicht komplett identisch sind und sich damit Peptidrückgrat und Seitenketten geringfügig unterscheiden, differiert die Anordnung der Diphosphate im aktiven Zentrum, bei gleicher Ausrichtung minimal. Wie in Abbildung 27

ersichtlich, unterscheiden sich die beiden Terpenzyklen im aktiven Zentrum lediglich in Hinsicht auf C343, welches in CsTps2 gegen A337 ausgetauscht ist. An gleicher Position variiert die (+)-Bornyldiphosphat-Synthase durch S320. Ferner weicht deren Sequenz durch F578 und I344 von (-)-Limonen- und (+)- α -Pinen-Synthase ab. Die Einflüsse dieser Aminosäuren auf die katalytische Aktivität werden in Kapitel 3.2.8. diskutiert.

3.2.5. Mutationsanalysen

Durch den Vergleich der unterschiedlichen aktiven Zentren beider Terpenzyklen und des Templates konnten insgesamt vier Aminosäurereste identifiziert werden, welche vermutlich einen direkten Einfluss auf die Biokatalyse haben. Ausgehend vom betreffenden Gen der *Cannabis sativa* (-)-Limonen-Synthase, sollten über zielgerichtete Mutationsexperimente diese Aminosäuren selektiv ausgetauscht werden. Dabei war das Ziel eine entsprechende (+)- α -Pinen-Synthase C343A Einzelmutante, bzw. die respektiven (+)-Bornyldiphosphat-Synthase- C343S (Einzelmutante), C343S / H602F (Doppelmutante) und C343S / H602F / Y367I (Dreifachmutante) Mutanten zu erzeugen. Von diesen sollte eine Veränderung des Produktspektrums bezüglich des Hauptproduktes der (+)- α -Pinen-Synthase bzw. der (+)-Bornyldiphosphat-Synthase zu erwarten sein. Darüber hinaus wären Aussagen über die Beteiligung der einzelnen Aminosäuren am Katalysemechanismus möglich. Ein Einfluss auf die Enzymaktivität könnte zusätzlich die Korrektheit des Modells sichern und dessen Aussagekraft bestärken. Schließlich konnten, ähnlich den Mutationsstudien in Kapitel 3.1.6., mit der Methode nach Takagi die zugehörigen Gene der oben benannten Enzyme modifiziert werden [97]. Diese wurden nach Restriktionsverdau der maternalen Stränge mit DpnI, sowohl mit Hexahistidylrest, als auch ohne dieses Epitop in pET101 D-TOPO kloniert. In kompetenten *E. coli* BL21-RIL, erfolgte die Amplifikation der Plasmide, welche nach Aufreinigung abschließend mittels Dye-Terminations-Sequenzierung verifiziert werden konnten. Abgesehen von den vorgesehenen mutagenisierten Aminosäuren stellten sich in allen Konstrukten zwei zusätzliche, identische Veränderungen des ORF dar, welche aber nicht zu einer Verschiebung des Leserahmens führten. Spontane Mutationen, durch die Reduplikation von *E. coli* verursacht, können dabei weitestgehend ausgeschlossen werden, da beide Austausche (L309V und G589S) mit unterschiedlichen Klonen reproduzierbar waren. Wie sich zeigte, war aber diesbezüglich keine Beeinträchtigung der Enzymaktivität festzustellen, was die Vermutung nahe legt, dass die Fehler ihren Ursprung in der Sequenzierung, oder bereits in den Originaldaten haben [53] müssen. Die Expression aller

Konstrukte erfolgt in *E. coli* BL21-RIL mit entsprechender Antibiotika-Selektion (2.2.11.1.). Durch Induktion der Genexpression mit 0,1 mM IPTG bei einer OD₆₀₀ von 0,6-0,9 resultierte eine maximale Proteinkonzentration ohne Bildung von *inclusion bodies*. Zellaufschluss und Proteinreinigung (Ni-NTA) ergaben nach Bestimmung mittels BCA-Methode bis zu 15 mg der ~90% reinen Enzyme, welche in Abbildung 28 mittels Western-Blot dargestellt sind. Dabei entspricht CsTps1 dem unmodifizierten Wildtyp der (-)-Limonen-Synthase. Alle weiteren abgebildeten Banden repräsentieren die jeweiligen Einzel-, Doppel- und Dreifachmutanten, ausgehend von CsTps1. Das Entsalzen mit PD10 hatte, wider Erwarten einen 25%igen Konzentrationsverlust zur Folge, aber keinerlei Einfluss auf die Gesamtaktivität. Zusammenfassend kann bis hierhin festgehalten werden, dass allein anhand der Computermodelle vier Aminosäuren identifiziert werden konnten, welche möglicherweise einen Einfluss auf die Enzymaktivität haben. Diese wurden durch Punktmutation erfolgreich in unabhängige Enzymvarianten umgesetzt, und sollen im Folgenden bezüglich ihrer Produkte analysiert werden.

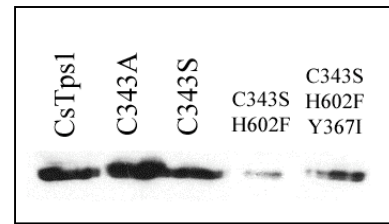


Abbildung 28: Chemolumineszenter Western-Blot der verschiedenen Enzyme bei ca. 62 kDa. Die Intensität der Banden ist dabei nicht proportional zur Expressionsrate.

3.2.6. Produktanalyse

In vorangegangenen Untersuchungen zum Produktspektrum beider Terpensynthasen [53] konnte (-)-Limonen (CsTps1) und respektive (+)- α -Pinen (CsTps2) als Hauptprodukt des jeweiligen Enzyms bestimmt werden. Mit freundlicher Unterstützung von R. Weber wurden sowohl CsTps1 als auch alle davon abgeleiteten mutierten Konstrukte bezüglich ihrer Produktspezifität analysiert [109]. Dazu erfolgte eine Inkubation der Enzyme für 3 h bei 30 °C mit GPP. Anschließend wurden die gebildeten Produkte sowohl in der organischen Phase (Hexan), als auch in der wässrigen Phase mittels GC-MS identifiziert. Die resultierenden Spektren sind in Abbildung 29 gegenübergestellt. Dabei zeigte sich, dass durch CsTps1 neben (-)-Limonen, α -Pinen, β -Pinen, Myrcen und Terpinolen auch Spuren von Linalool, Fenchol, *trans*-Pinan-2-ol, *cis*-Pinan-2-ol, α -Terpineol, Geraniol, Camphen, Menthenol, und *trans*-Citral gebildet werden. Die präzise Zusammensetzung des Produktspektrums inklusive der Quantitäten ist in Tabelle 10 für den Wildtyp und die erzeugten Mutanten aufgelistet. Die prozentualen Angaben entsprechen den Mittelwerten von Doppelbestimmungen. Die relativen Aktivitäten beziehen sich auf den Wildtyp, dessen

Gesamtaktivität auf 100% festgelegt wurde. Der Vergleich der vier Mutanten mit CsTps1 (100%) zeigt, mit Ausnahme von C343A (118,2%), eine graduelle Reduktion der Gesamtaktivität von C343S (81,3%) über H602F (26,1%) bis nahe zum kompletten Aktivitätsverlust bei Y367I (2,9%). Für C343A, C343S und C343S / H602F stellt (-)-Limonen weiterhin das Hauptprodukt dar, wohingegen bei C343S / H602F / Y367I eine starke Produktverschiebung zu Linalool zu verzeichnen ist (fettgedruckt in Tabelle 10). Dennoch verringert sich die Konzentration des produzierten (-)-Limonen für alle Mutanten, außer für C343A. Die Bildung von (-)-Linalool verhält sich dabei umgekehrt proportional und bezogen auf die relative Aktivität kann eine Maximalkonzentration (über 100% mehr als bei CsTps1) bei C343S / H602F beobachtet werden. Zusätzlich ist eine vermehrte Bildung von α -Pinen, β -Pinen, Camphen, *trans*-Pinan-2-ol und *cis*-Pinan-2-ol bei C343A und C343S erkennbar.

Tabelle 10: Produktspektrum der von CsTps1 und den mutierten Varianten

Monoterpen-Produkt in %	Enzym				
	CsTps1	C343A	C343S	C343S H602F	C343S H602F Y367I
(-)-Limonen	68,5	65,5	63,5	44,4	15,2
α-Pinen	2,0	2,9	2,2	4,9	2,4
β-Pinen	3,6	4,7	5,3	5,9	0,4
Camphen	0,1	0,2	0,6	0,2	0,0
Myrcen	4,7	5,6	4,9	7,9	1,6
Menthenol*	0,3	0,5	0,4	0,7	3,0
α-Terpinolen	1,7	1,8	1,6	2,3	1,5
Linalool	2,6	2,3	3,2	10,8	39,3
Fenchol	3,5	2,7	4,4	2,1	0,0
<i>trans</i>-Pinan-2-ol*	2,1	2,1	3,0	2,4	0,0
<i>cis</i>-Pinan-2-ol	0,5	0,6	0,7	1,2	0,6
α-Terpineol	5,3	5,4	5,6	6,6	8,5
Geraniol	4,6	5,2	4,1	8,7	19,6
<i>trans</i>-Citral	0,4	0,6	0,5	2,0	8,3

Relative Aktivität	100,0	118,2	81,3	26,1	2,9
---------------------------	-------	-------	------	------	-----

Prozentuale Zusammensetzung des Produktspektrums der verschiedenen Enzyme. Alle Werte resultieren aus der Integration der entsprechenden Produktpeaks aus dem Totalionen-Chromatogramm. Die Angaben entsprechen den Mittelwerten von Doppelbestimmungen. Für C343S / H602F / Y367I ist eine deutliche Produktverschiebung von (-)-Limonen zu Linalool zu verzeichnen. Die aufgeführte relative Aktivität bezieht sich bei allen Mutanten auf die Gesamtaktivität des Enzyms bezogen auf CsTps1 (Wildtyp=100%). Die Strukturen der identifizierten Verbindungen sind in Abbildung 37 (Anhang) dargestellt. *Zuordnung nur über NIST-Datenbank-Vergleich

Durch die Behandlung der wässrigen Lösung mit einer sauren Weizenkeim Phosphatase konnte völlig unerwartet die Bildung von (-)-Bornylalkohol verzeichnet werden. Da ohne die Phosphatasereaktion kein (-)-Borneol detektiert werden konnte, ist davon auszugehen, dass dieses ursprünglich aus (-)-Bornyldiphosphat resultieren muss. Durch den indirekten Nachweis ist die Quantifizierung des Borneols nicht eindeutig möglich. Die entsprechenden Werte sind deshalb hier nicht aufgeführt. Die Konzentration des gebildeten (-)-Bornyldiphosphats verhält sich dabei aber proportional zur Konzentration von (-)-Limonen.

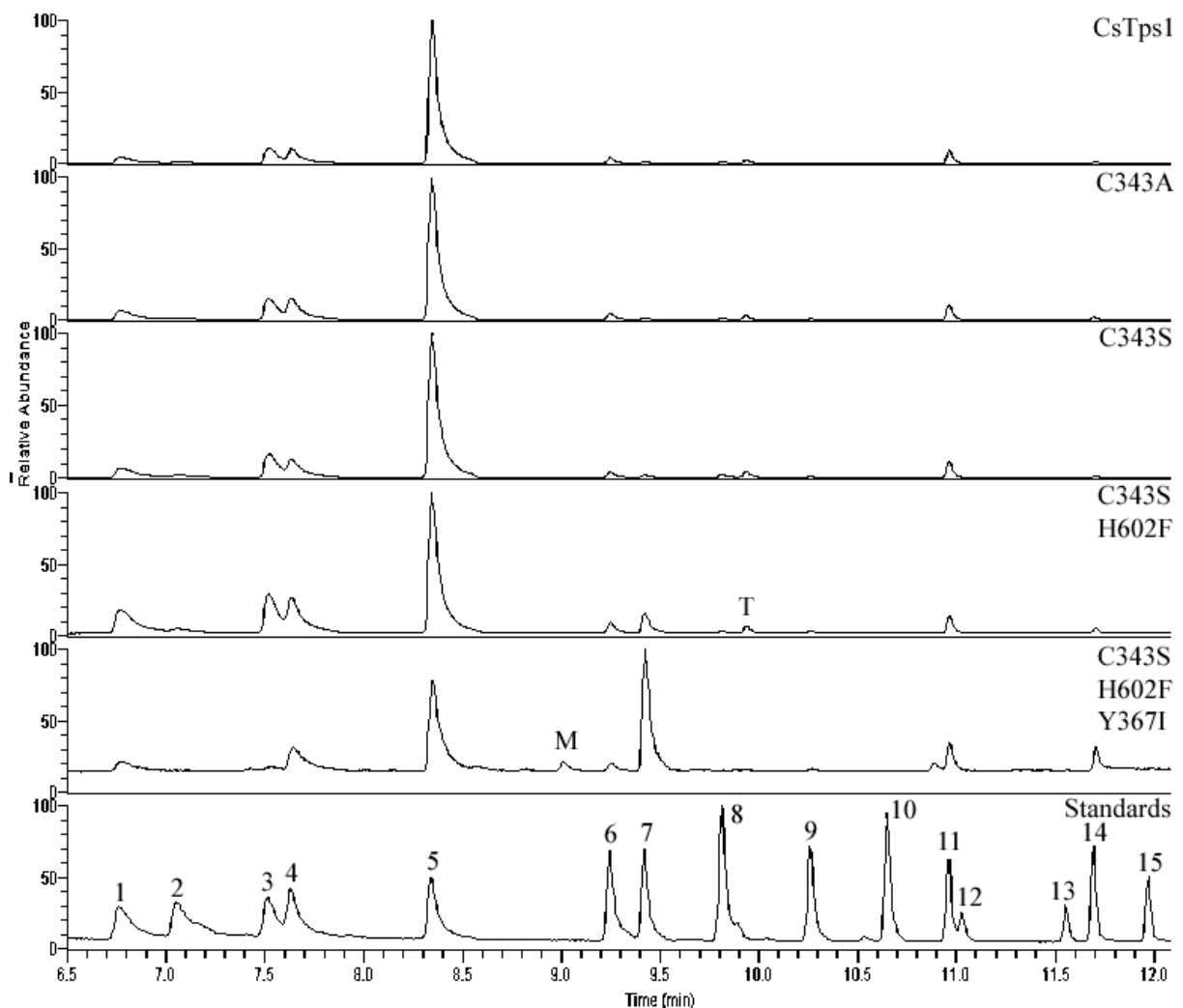


Abbildung 29: Gegenüberstellung der GC-MS-Spektren von CsTps1 und den mutagenisierten Enzymen, inklusive des zusammengesetzten Standard-Spektrums. (1) α -Pinen; (2) Camphen; (3) β -Pinen; (4) Myrcen; (5) (-)-Limonen; (6) α -Terpinolen; (7) Linalool; (8) Fenchol; (9) cis-Pinan-2-ol; (10) (+)-Borneol; (11) α -Terpineol; (12) γ -Terpineol; (13) cis-Citral; (14) Geraniol; (15) trans-Citral. Für Menthenol (M) und trans-Pinan-2-ol (T) waren keine Standards verfügbar. Deren Identität wurde anhand der Masse über die NIST-Datenbank zugewiesen, wobei diese keine eindeutige Zuordnung erlaubt.

Durch die beobachteten Ergebnisse kann zweifellos auf die Beteiligung der identifizierten Aminosäuren am Katalysemechanismus geschlossen werden. Dennoch sind hier noch keine Aussagen über deren mechanistischen Einfluss möglich. Mit Hilfe quantenmechanischer Analysen wird nun angestrebt, katalytische Aspekte der veränderten Aminosäurereste zu charakterisieren.

3.2.7. Quantenmechanische Untersuchungen zum Katalysemechanismus

Die Ergebnisse der Produktanalyse zeigen den essentiellen Einfluss von H602 auf die Aktivität der (-)-Limonen-Synthase. Anhand dieser Beobachtung und mit der Kenntnis über die dreidimensionale Anordnung der Aminosäuren im möglichen aktiven Zentrum, sollten quantenmechanische- und QM/MM-Berechnungen durchgeführt werden. Diese könnten weitere Einblicke in einen möglichen Katalysemechanismus von GPP zu (-)-Limonen preisgeben und eine Erklärung für den enormen Aktivitätsverlust durch Austausch des H602 gegen Phenylalanin liefern. Wie bereits mehrfach erläutert, ist anzunehmen, dass während der Biokatalyse ein intermediäres Terpinyl-Kation gebildet wird, welches durch Deprotonierung zu (-)-Limonen reagieren kann.

Aus den unterschiedlichsten Enzymen ist die Existenz katalytischer Ladungs-Transfer-Systeme bekannt, welche durch temporäre Verschiebung ihrer Protonen die Biokatalyse der entsprechenden Substrate ermöglichen. Beispielsweise erfolgt die Deprotonierung des Substrats im Modell der Betanidin-5-O-Glucosyltransferase durch eine E394-H22-Diade [110]. Weitere Protonen-Transfer-Systeme des Typs Asp-His-Ser finden sich in Serin-Proteasen [111;112].

Im Modell der (-)-Limonen-Synthase konnte eine entsprechende Anordnung der Aminosäuren D600 und H602 identifiziert werden, welche dem Typ einer solchen katalytischen Diade entspricht. Durch eine Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem ϵ -Proton von H602 und der Carboxylgruppe von D600 wird die Basizität von Histidin erhöht und die Deprotonierung des Terpinyl-Kations ermöglicht. Letzteres befindet sich nach einer manuell im Modell initiierten Zyklisierung, ausgehend von der gedockten Geometrie (siehe Kapitel 3.2.4.) in einer entsprechenden Entfernung zum η -Stickstoff des H602. Im Folgenden wurde mit Hilfe semiempirischer quantenmechanischer Berechnungen der formale Reaktionsmechanismus unter Berücksichtigung der oben erörterten Aspekte bestimmt. Ausgehend vom postulierten Mechanismus einer Allylumlagerung des GPP zum Linalyldiphosphat über das intermediäre Terpinyl-Kation bis hin zu (-)-Limonen, konnten die Bildungsenthalpien und

Reaktionsenergien für alle beteiligten Spezies (siehe Abbildung 30) mit PM3 ermittelt werden. Die konservierte Aminosäure Arginin516, durch dessen Guanidinogruppe eine Ladungskompensation von Geranyldiphosphat sowie des isolierten Diphosphats erfolgt, geht zur Vermeidung ionischer Zwischenstufen in die Berechnungen ein. In den ersten beiden Schritten (30.A und 30.B) der Kalkulation ist die Umlagerung des Diphosphats auf das C-3-Atom der Prenylspezies dargestellt. Ein komplett isoliertes Diphosphat, wie in 30.B dargestellt, ist dabei aber unwahrscheinlich. Vielmehr soll diese Zwischenstufe einem ersten Übergangszustand entsprechen, welcher mit einem Energieaufwand von $\Delta_R H^1 = 12,5$ kcal/mol erreicht werden kann. Das gebildete Linalyldiphosphat ist mit einem Energiegewinn von $-9,28$ kcal/mol gegenüber Geranyldiphosphat thermodynamisch begünstigt (Differenz $\Delta H_{f3} - \Delta H_{f1}$). Gemäß Gleichung 30.C erfolgt letztendlich die Abspaltung des Diphosphats, dessen negative Ladung durch R516 und Mg^{2+} kompensiert wird. Zusätzlich erfolgt die Übertragung eines Protons von R516 auf ein Sauerstoffatom des α -Phosphats. Die Zyklisierungsreaktion zwischen C-1 – C-6 führt mit einem weiteren Energieaufwand von $\Delta_R H^3 = 7,1$ kcal/mol zum Terpinyl-Kation. Der oben diskutierte Ladungstransfer H602-D600, vom Typ einer katalytischen Diade, ermöglicht gemäß Gleichung 30.D die Übertragung eines α -Carbinyl-Protons auf ϵ -Histidin (vergleiche auch Abbildung 32). Das resultierende (-)-Limonen (Gleichung 30.E) entspricht einem Energiegewinn von $\Delta_R H^5 = -138,39$ kcal/mol.

Die Regeneration des Enzyms (Gleichung 30.F) erfolgt vermutlich durch die Übertragung des ursprünglichen α -Carbinyl-Protons, gegebenenfalls über Wasser zurück auf R516. Die energetische Bilanz der gesamten Umlagerungs-Zyklisierungs-Reaktion beträgt $\Delta_R H^6 = -35,54$ kcal/mol (Differenz $\Delta H_{f6} - \Delta H_{f1}$).

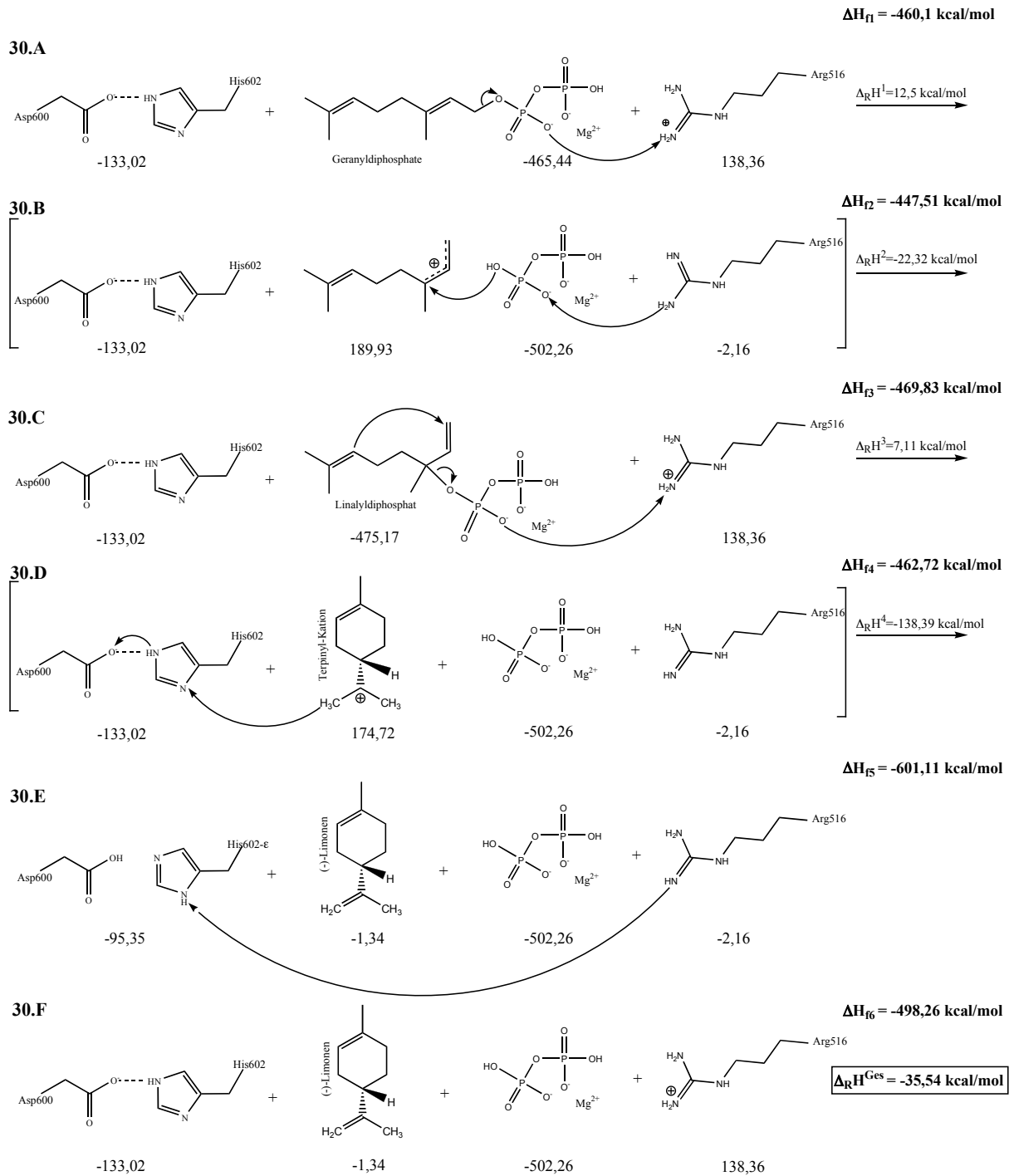


Abbildung 30: Reaktionsmechanismus der Zyklisierung von Geranyldiphosphat zu (-)-Limonen mit kalkulierten Bildungsenthalpien der beteiligten Spezies. (A) Abspaltung des Diphosphats vom Prenylrest mit anschließender Umlagerung an C-3 und Transfer eines Protons von R516 auf den Sauerstoff des α -Phosphats zur Ladungskompensation (B); (C) C-1 – C-6 – Zyklisierung zum Terpinyl-Kation und gleichzeitige Ladungskompensation des endgültig abgespaltenen Diphosphats durch R516; (D) Protonenverschiebung von H602 auf D600 (katalytische Diade) und Transfer eines α -Carbonyl-Protons vom Terpinyl-Kation auf ϵ -H602 unter Bildung von (-)-Limonen (E); (F) Regeneration des Enzyms durch Übertragung des ursprünglichen α -Carbonyl-Protons auf Wasser mit anschließendem Transfer auf R516.

Anhand der semiempirischen quantenmechanischen Analysen konnte gezeigt werden, dass ein Allylumlagerungsmechanismus bezogen auf die Thermodynamik der Reaktion, prinzipiell möglich ist. Ebenso ist nun die Bedeutung von H602 interpretierbar, welches in Kombination mit D600 eine katalytische Diade ausbildet und zur Deprotonierung des Terpinyl-Kations führt. Ungeachtet dessen stellen alle bis hierhin durchgeführten Berechnungen nur grobe Näherungen an physiologische oder native Bedingungen im Enzym dar. Da keine Reaktionskinetiken bestimmt wurden, sind entsprechend auch keine Aussagen über Energiebarrieren oder eventuelle Übergangszustände möglich. Schwerwiegender ist allerdings die Tatsache, dass sich alle Kalkulationen mit PM3 (Methodenbedingt) nur auf die isolierten Spezies in der Gasphase beziehen. Da während enzymatisch ablaufenden Prozessen allerdings das Lösungsmittel bzw. die Proteinumgebung im aktiven Zentrum einen enormen Einfluss hat, wird die Aussagekraft dieser semiempirischen Berechnungen gemindert. Um dem entgegenzuwirken empfiehlt sich die Verwendung von QM/MM-Systemen, welche die Betrachtung des gesamten Enzyms (Molekülmechanik) inklusive des aktiven Zentrums mit Liganden (Quantenmechanik) erlauben. Im Folgenden soll die Herangehensweise bei der Analyse der eben beschriebenen Problematik mittels QM/MM-Berechnungen beschrieben werden.

Anfangs wurde ausgehend von der Dockingordnung (vergleiche Kapitel 3.2.4.) von GPP im Modell der CsTps1 eine QM/MM-Geometrieoptimierung mit GAUSSIAN durchgeführt. Unter Verwendung des Basissatzes STO3G* und der Hartree-Fock-Methode sollten nun GPP, H602, D600 sowie D519, D374 und D378 inklusive der Magnesiumionen quantenmechanisch, und das restliche Protein molekülmechanisch berechnet werden. Nach einer Kalkulationszeiten von ~4 Wochen und länger, auf einem parallelen Rechensystem (Kapitel 2.1.9.) resultierten keine interpretierbaren Energien bzw. Molekülgeometrien. Auch die Wahl anderer Basissätze und die Verkleinerung des QM-System führten nicht zu Ergebnissen, die zur Interpretation des Katalysemechanismus verwendet werden konnten. Unter diesen Gegebenheiten war eine Berechnung entsprechender Reaktionskoordinaten, welche authentische Start- bzw. Endstrukturen voraussetzt, nicht möglich.

Nach zahlreichen Versuchen gelang schließlich mit dem Programm Qsite die QM/MM-Geometrieoptimierung des entsprechend orientierten Terpinyl-Kations (siehe Seite 87) und von (-)-Limonen. Die Berechnung des quantenmechanischen Anteils, welcher sowohl das Terpinyl-Kation, als auch D600 und H602 beinhaltet, erfolgte mit der Hartree-Fock-Methode und dem Basis-Satz lacvp*. Die Eigenschaften aller übrigen Protein- und Ligandenbestandteile gingen über das Kraftfeld OPLS2001 in die Kalkulation ein. Die

resultierende Konformation des Terpinyl-Kations ist in Abbildung 31 gezeigt. Dabei befindet sich ein Proton des α -Carbinyls in einer Distanz von 2,3 Å zum η -Stickstoff von H602. Eine Wasserstoffbrücke zwischen H602 und D600 erhöht, wie bereits diskutiert die Basizität von Histidin und ermöglicht somit die Deprotonierung des Terpinyl-Kations. In einem weiteren Schritt erfolgt die konzertierte Übertragung des Protons auf D600 während das Terpinyl-Kation deprotoniert und (-)-Limonen gebildet wird (siehe Abbildung 32).

Die mit Qsite berechnete QM/MM-Energie in Hartree ist für die Ausgangsgeometrie in Abbildung 31 und die Endgeometrie in Abbildung 32 dargestellt. Die Bildung von (-)-Limonen, ausgehend von einem Terpinyl-Kation ist um -0,0958 Hartree thermodynamisch begünstigt, was 60,115 kcal/mol entspricht.

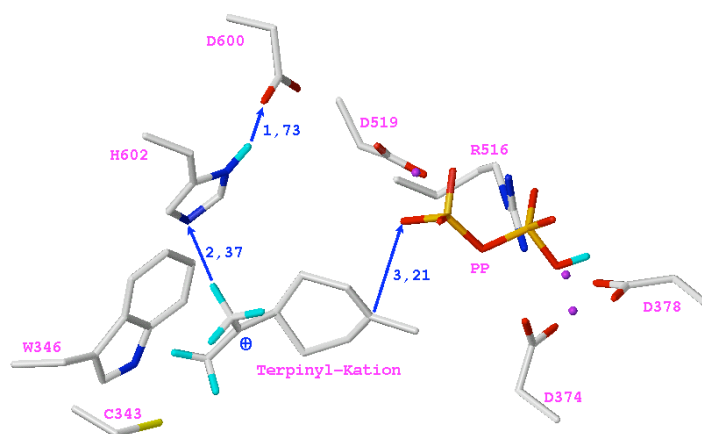


Abbildung 31: QM/MM-Startkonformation des intermediären Terpinyl-Kations. Ein Proton des α -Carbinyls befindet sich in einer Distanz von 2,37 Å zum ϵ -Stickstoff des H602. Das Diphosfat ist bereits abgespalten und verbleibt durch die koordinierten Mg^{2+} -Ionen in dieser Position fixiert. QM-Teil für diese Berechnung: H602, D600, Terpinyl-Kation. (entspricht Abbildung 30.4) (E_h : -917,1440 Hartree)

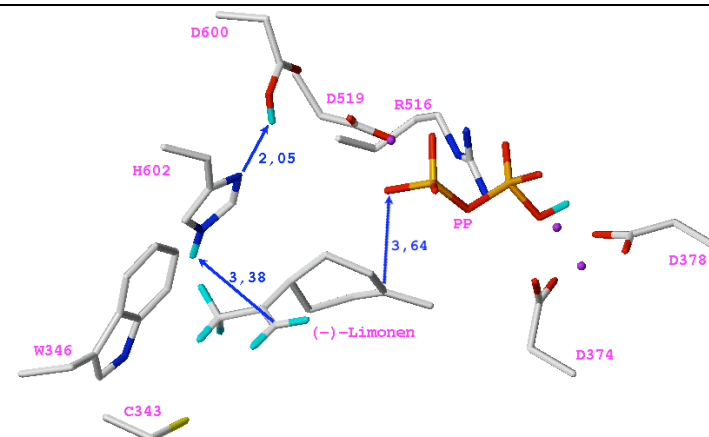


Abbildung 32: QM/MM-Endgeometrie mit gebildetem (-)-Limonen und transferierten Ladungen zwischen H602 und D600. Sowohl H602 als auch D600 müssen nach abgeschlossener Reaktion regeneriert werden. QM-Teil für diese Berechnung: H602, D600, (-)-Limonen. (entspricht Abbildung 30.5) (E_h : -917,2398 Hartree)

Stellt man diese Ergebnisse und die semiempirischen Resultate ($\Delta_R H^4$ in Abbildung 30) gegenüber, zeigen sich Ähnlichkeiten bezüglich der Thermodynamik. Obwohl ein direkter Vergleich beider Methoden natürlich nicht möglich ist, bestärken sowohl die QM/MM-, als auch die semiempirischen Berechnungen die Existenz einer katalytischen Diade zwischen H602 und D600 oder zumindest die essentielle Bedeutung von H602.

3.2.8. Zusammenfassende Diskussion - Terpensynthesen

Unter Verwendung der Röntgenkristallstruktur von (+)-Bornyldiphosphat-Synthase konnten mit Methoden des Homologie Modellings Strukturmodelle der (-)-Limonen- und (+)- α -Pinen-Synthase aus *Cannabis sativa* erstellt werden. Die vergleichsweise hohe Sequenzidentität und die Tatsache, dass (+)-Bornyldiphosphat-Synthase ausgehend von Geranyldiphosphat eine Reaktion über ein intermediäres Terpinyl-Kation bis hin zu einem zyklischen Monoterpen katalysiert, macht diese zu einem ausgezeichneten Template. Das Strukturmodell der (-)-Limonen-Synthase ist durch seine hohe Qualität und Aussagekraft von der Protein Data Bank akzeptiert und mit dem PDB-Code: 2DK0 hinterlegt. Anhand struktureller Alignments (siehe Abbildung 27) konnten die möglichen aktiven Zentren beider Terpensynthesen identifiziert und charakterisiert werden. Die daraus abgeleiteten, minimalen Differenzen in der Komposition der Aminosäuren bildeten eine wesentliche Voraussetzung für Mutationsstudien. Diese wären allein durch Vergleichen der Sequenzen nicht möglich gewesen, da sich die Unterschiede in den aktiven Zentren nicht auf sequenziell konservierte Motive beschränken. Damit ist die Kenntnis der dreidimensionalen Struktur unumgänglich.

Insgesamt konnten vier verschiedene Aminosäurereste identifiziert werden, welche nach Mutation zu einer Veränderung der Produktspezifität oder der Enzymaktivität führen sollten. Wie in der Abbildung 27 ersichtlich, unterscheiden sich (-)-Limonen-Synthase und (+)- α -Pinen-Synthase im aktiven Zentrum lediglich in einer Aminosäure – C343. An Stelle dessen findet sich in der (+)- α -Pinen-Synthase Alanin. Vergleicht man beide Modelle mit der (+)-Bornyldiphosphat-Synthase, so lassen sich drei Unterschiede im aktiven Zentrum ableiten. C343 ist in der (+)-Bornyldiphosphat-Synthase gegen Serin ausgetauscht, wohingegen die Positionen der Aminosäuren H602 und Y367 durch Phenylalanin bzw. Isoleucin ersetzt sind. Ausgehend vom Gen der (-)-Limonen-Synthase wurden über gezielte Mutationsexperimente die jeweiligen Konstrukte erstellt. Nach Expression und Reinigung der C-terminal histidylierten Proteine konnten Enzymassays mit anschließender GC-MS-Analyse der Produkte Aufschluss über den Einfluss der Mutationen geben. Für alle modifizierten Enzyme ergaben sich, wie in Tabelle 10 und Abbildung 29 dargestellt, unterschiedliche Produktspezifitäten und Aktivitäten. Diese reichten von leichten Veränderungen der relativen Aktivität bis hin zur vollständigen Verschiebung des Produktspektrums oder zum nahezu kompletten Aktivitätsverlust. Die dabei größte Auswirkung zeigten die Mutationen von H602 zu Phenylalanin bzw. Y367 zu Isoleucin. Letztere hatte, abgesehen von einem sehr starken Verlust der relativen Aktivität eine immense Verschiebung der Produktspezifität mit einem

neuen Hauptprodukt (Linalool) zur Folge. Dementsprechend handelt es sich bei dieser Mutante im eigentlichen Sinne nicht mehr um eine (-)-Limonen-Synthase, sondern vielmehr um eine Linalool-Synthase. Der starke Rückgang der relativen Aktivität ist teilweise durch den Verlust des π -Elektronensystems von Tyrosin zu erklären. Dieses kann, sofern nicht mutiert, durch seine negative „Elektronenwolke“ die Ausbildung eines Linalyl-Kations an C1 stabilisieren und somit die Zyklisierung zum Terpinyl-Kation wesentlich begünstigen. In Analogie dazu ist für eine Epi-Aristolochen-Synthase aus Tabak der Einfluss von Y527 beschrieben. Dabei erfolgt die Stabilisierung eines Carbokations an C1 von Farnesyldiphosphat, vermittelt durch die π -Elektronen des Tyrosins [104]. Durch Eliminieren der charakteristischen Funktion von Tyrosin, wird die Bildung des Linalyl-Kations und damit die Zyklisierung von GPP erschwert oder sogar verhindert. Darüber hinaus muss aber vermutet werden, dass mit dem Austausch zu Isoleucin sterische Veränderungen im aktiven Zentrum verbunden sind. Dadurch wäre eine entsprechende Vorfaltung und somit auch Zyklisierung von GPP zum Produkt nicht mehr gewährleistet. Als eine weitere Konsequenz könnte die Affinität zwischen Substrat und Enzym derart verringert sein, dass ein Binden von Geranyldiphosphat nur noch schlecht, bzw. gar nicht mehr möglich ist. Demnach bildet, wie in 3.2.6. beobachtet das lineare Linalool das Hauptprodukt der Enzymreaktion. Betrachtet man, bezogen auf die relative Aktivität der einzelnen Enzyme die Proportionen der gebildeten Produkte, zeigt sich bereits bei C343S / H602F eine enorm verstärkte Bildung von Linalool (~100% mehr als CsTps1). Unter Berücksichtigung der quantenmechanischen Analysen (3.2.7.) kann dieser Effekt folgendermaßen erklärt werden. Nach Bildung des Terpinyl-Kations und der entsprechenden Orientierung im aktiven Zentrum (vergleiche Abbildung 31) kann, initiiert durch ϵ -H602, eine Deprotonierung (α -Carbinyll) des Kations erfolgen. Sowohl das gebildete (-)-Limonen, als auch der gesamte Zyklisierungsprozess sind thermodynamisch begünstigt (siehe 3.2.7. und Abbildung 30). Eine Mutation zu Phenylalanin würde den Protonentransfer vom Imidazol (H602) auf die Carboxylgruppe (D600) unterbrechen und die Deprotonierung des Terpinyl-Kations auf diese Weise verhindern. Infolge dessen würde das Terpinyl-Kation vermutlich zurück zum Linalyl-Kation reagieren. Ein adäquater Mechanismus eines so genannten *charge relay systems*, ist für eine Pentalenen-Synthase (Sesquiterpen-Synthase) beschrieben [113]. Dabei fungiert H309 als Protonenakzeptor bei der Zyklisierung von Farnesyldiphosphat zu Humelen bzw. Pentalenen.

Weniger schwerwiegend auf die biokatalytische Funktion der (-)-Limonen-Synthase wirkten sich die Mutationen C343A und C343S aus, obwohl überraschenderweise mit C343A eine Zunahme der relativen Aktivität von ~20% verbunden war (siehe Tabelle 10). Eine merkliche

Veränderung des Produktspektrums konnte jedoch bei beiden nicht beobachtet werden. Der Einfluss von Alanin auf die Katalyse kann nur auf sterische Ursachen zurückzuführen sein, vergrößert sich doch der Reaktionsraum im aktiven Zentrum durch das deutlich geringere Volumen von Alanin. Daher ist anzunehmen, dass Geranyldiphosphat im modifizierten aktiven Zentrum über einen größeren Faltungsraum verfügt und die Produkte somit schneller bzw. ungehinderter gebildet werden können.

Da sich Cystein und Serin bezüglich ihres Volumens nur minimal unterscheiden, sollten durch die Mutation C343S keine markanten Veränderungen bezüglich des Katalysemechanismus zu erwarten sein. Der geringe Rückgang der relativen Aktivität um ~20% in C343S ist aber vermutlich mit der höheren Elektronegativität von Sauerstoff begründbar, welche sich störend auf die Bildung und Stabilisierung des Terpinyl-Kations in der (-)-Limonen-Synthase auswirken kann. Weiterhin konnte nach Behandlung des wässrigen Extraktes mit einer sauren Phosphatase unerwartet die Bildung von (-)-Bornyldiphosphat verzeichnet werden – ein zusätzliches Indiz auf die Existenz eines intermediären Terpinyl-Kations.

Abschließend kann festgehalten werden, dass alle, von den Homologie Modellen abgeleiteten Mutationen, einen Einfluss auf die Enzymaktivität und Produktspezifität zeigen. Diese Beobachtungen bestärken nicht nur die Aussagekraft der entwickelten Modelle, sondern ermöglichen auch einen tieferen Einblick in mechanistische Aspekte der Biokatalyse von Monoterpenen. Nicht zuletzt durch quantenmechanische Berechnungen war es möglich, eine katalytische Diade im aktiven Zentrum der (-)-Limonen- und (+)- α -Pinen-Synthase zu identifizieren. Die in Kapitel 3.2.5. geplante, vollständige Veränderung des Produktspektrums konnte nicht erzielt werden. Vermutlich spielen andere Aminosäuren, welche aber weiter vom eigentlichen aktiven Zentrum entfernt sind, eine Rolle bei dessen Faltung und Ausbildung.

Die in diesem Kapitel diskutierten Resultate und Konsequenzen bilden die Grundlage für weit reichende Modifikationen an Monoterpensynthasen, nicht nur von solchen aus *Cannabis sativa*. Weiterhin können die dreidimensionalen Strukturen bei der Entwicklung neuer Liganden oder Inhibitoren für diese Enzyme hilfreich sein und dementsprechend die unterschiedlichsten Einflüsse auf den Sekundärmetabolismus in Pflanzen, Tieren oder Bakterien haben.

Perspektivisch sollten die jeweiligen Einzelmutanten (H602F und Y367I) eventuell weitere Einblicke in den Katalysemechanismus gewähren. Als logische Konsequenz wären die

Mutationen C343A / Y367I, respektive C343A / H602F anzustreben. Von diesen würde eine Erhöhung der relativen Aktivität, verbunden mit einem veränderten Produktspektrum des Enzyms zu erwarten sein. Um die Existenz einer katalytischen Diade zu bestätigen, könnte eine D600A Mutation hilfreich sein. Durch einen solchen Alaninaustausch wäre die diskutierte Protonenübertragung von H602 nicht mehr möglich. Demnach würde die, durch H602 vermittelte Deprotonierung des Substrats erschwert und die Aktivität des Enzyms verringert. Weiterhin könnten Aminosäuren spezifisch ausgetauscht werden, welche eine größere Distanz zum aktiven Zentrum aufzeigen, oder gar an der Komplexierung des Diphosphats beteiligt sind.

Ferner dürften weitere QM/MM-Berechnungen zu einem besseren Verständnis der Zyklisierungsreaktion und dem immensen Produktspektrum der Terpensynthesen beitragen.

4. Zusammenfassung

4.1. Zusammenfassung der Ergebnisse

Einleitung

Nach wie vor stellen die Isoprenoide / Terpenoide mit mehreren zehntausend Vertretern die wohl größte Klasse der Naturstoffe dar. Daher ist es nicht verwunderlich, dass die Mannigfaltigkeit der entsprechenden Enzyme ebenso zahlreich wie divers ist. Man kann prinzipiell verschiedene Klassifizierungen prenylierender Enzyme vornehmen, sei es nach Art der katalysierten Reaktion, ihrer zellulären Lokalisation oder nach EC-Nomenklatur. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag hauptsächlich auf aromatischen Prenyltransferasen und Monoterpen-Synthesen. Während ein Großteil der aromatischen Prenyltransferasen membrangebunden und daher schwer zugänglich ist, existieren für die Terpensynthesen bereits umfangreiche Charakterisierungen und zum Teil sogar Röntgenkristallstrukturen. Dennoch besteht noch ein großer Bedarf, Katalysemechanismen zu verstehen und das immense Produktspektrum, durch welches sich insbesondere die Terpenzyklen auszeichnen, nachvollziehen zu können. Nicht zuletzt die durch aromatische Prenyltransferasen katalysierte C-C-Bindungsknüpfung ist von außerordentlichem Interesse für die synthetisch-chemische Forschung. Lassen sich doch derartige Reaktionen oftmals nur unter relativ „harten“ und unphysiologischen Reaktionsbedingungen oder unselektiv realisieren.

Problemstellung

Mit Hilfe des Molecular Modelling war es Ziel, über die Erstellung dreidimensionaler Computermodelle Einblicke in die Struktur der 4-Hydroxybenzoesäure oligoprenyltransferase bzw. in die Struktur zweier Terpensynthesen zu erlangen. Weiterhin sollte aus Dockinganalysen und quantenmechanischen Berechnungen (QM, QM/MM) ein weiteres Verständnis zu Katalysemechanismen (Zyklisierung bzw. aromatische Prenylierung) der betrachteten Enzyme möglich sein. Legt man die *in silico* Analysen zugrunde, sollten sich Ansatzpunkte für gerichtete Mutationsstudien ergeben. Deren Resultate würden dann einerseits ein Maß für die Aussagekraft der Modelle darstellen und andererseits gezielte Veränderungen des biokatalytischen Verhaltens der Enzyme zur Folge haben. Alle geplanten Experimente setzen die Nutzung molekularbiologischer-, mikrobiologischer- und chemo/bioinformatischer- Methoden und Techniken voraus.

Ergebnisse – Prenyltransferase (ubiA-Enzym)

Auf Basis des Photosynthesereaktionszentrums von *R. viridis* konnte ein erstes dreidimensionales Modell des ubiA-Enzyms aus *E. coli* entwickelt werden. Dieses sollte aber aufgrund der sehr geringen Sequenzidentität zur Template-Struktur nur als Annäherung an die tatsächliche Struktur angesehen werden. Trotzdem kann dieses Modell helfen, grundlegende Mechanismen der Katalyse zu verstehen. Aus den Untersuchungen resultierten zwei mögliche aktive Zentren, welche in Betracht gezogen werden müssen. Parallelen zu den kettenverlängernden Prenyldiphosphat-Synthasen konnten daraus abgeleitet werden und lassen einen gemeinsamen evolutionären Ursprung vermuten. Mit der Kenntnis der Modellstruktur wurden insgesamt fünf Aminosäuren in beiden aktiven Zentren mutiert, welche mutmaßlich an der Biokatalyse beteiligt sind. Die Aktivitätsverluste als Konsequenz der gezielten Punktmutationen sind der direkte Beweis für die Existenz von zwei aktiven Zentren. Zudem bestätigen sie die Anordnung der Aminosäuren im Modell. Identische Beobachtungen, nach Alaninaustauschen der vorgeschlagenen Aminosäuren in der entsprechenden Prenyltransferase in *Lithospermum erythrorhizon*, bestärken diese Resultate (persönliche Kommunikation - Kazufumi Yazaki, Kyoto, Japan). Ungeachtet dessen musste die entwickelte Struktur bezüglich seiner Tertiärstruktur mit der Transmembranhelix-Vorhersage TMHMM revidiert werden, da mit dem ursprünglichen Modell die räumliche Verknüpfung beider aktiver Zentren nicht erklärt werden konnten. Weiterhin wurde eine Hydrolaseaktivität sowohl für das ubiA-Enzym als auch für die mutierten Varianten bestätigt. Dies kann als zusätzliches Indiz auf die Existenz von zwei kombinierten aktiven Zentren angesehen werden. Eine visuelle Identifikation des ubiA-Enzyms mittels chromatographischer Methoden (Coomassie-Färbung, Western-Blot) war nicht eindeutig möglich.

Abgesehen von kleineren Unsicherheiten des Strukturmodells konnten mit semiempirischen quantenmechanischen Methoden verschiedene Aspekte der Substratspezifität beleuchtet werden. Diesen zeigen zusätzlich, dass der enzymatische Prozess thermodynamisch begünstigt ist und der Reaktionsverlauf einen S_N1 -Mechanismus vermuten lässt.

Ergebnisse – Terpenzyklasen

Unter Verwendung der Röntgenkristallstruktur von (+)-Bornyldiphosphat-Synthase wurden Modelle der (-)-Limonen- und (+)- α -Pinen-Synthase aus *Cannabis sativa* erstellt. Anhand struktureller Vergleiche konnten die möglichen aktiven Zentren beider Terpensynthasen identifiziert werden. Sich daraus ableitende Differenzen der Zusammensetzung des aktiven Zentrums stellten eine Grundvoraussetzung für Mutationsexperimente dar, welche allein anhand von Sequenzanalysen nicht möglich gewesen wären. Das Strukturmodell der (-)-Limonen-Synthase ist durch seine hohe Qualität und Aussagekraft von der Protein Data Bank akzeptiert und mit dem PDB-Code: 2DK0 hinterlegt.

Insgesamt ließen sich vier verschiedene Aminosäure-Reste identifizieren, welche ausgehend vom Gen der (-)-Limonen-Synthase verändert wurden und letztlich, wie vermutet zu unterschiedlichen Enzymaktivitäten führten. Alle Konstrukte, einschließlich des Wildtyps wurden exprimiert und über eine C-terminale Histidylisierung aufgereinigt. Nach enzymologischer Analyse und anschließender GC-MS-Charakterisierung der Produkte zeigten sich mehr oder minder starke Veränderungen, sowohl bezogen auf die Gesamtaktivität, als auch auf die Produktspezifität. Der markanteste Einfluss auf die Biokatalyse geht auf einen Histidin-Rest im aktiven Zentrum zurück und lässt nach quantenmechanischen Untersuchungen (PM3, QM/MM) die Existenz eines Landungs-Transfer-Systems vermuten. Die Mutation eines Tyrosins zu Isoleucin verschiebt das Produktspektrum des Enzyms derart, dass diese Mutante durch ein neues, nicht zyklisches Hauptprodukt ausgezeichnet ist. Doch nicht nur Aktivitätsverluste, sondern auch Steigerungen der relativen Aktivität konnten beispielsweise durch den Austausch eines Cysteins zu Alanin erreicht werden.

Die hier erörterten Ergebnisse tragen zum Verständnis der Prinzipien der Biokatalyse prenylierender Enzyme bei und bilden eine Grundlage für weitere effektive Modifikationen am Mechanismus der Prenylierung bzw. Zyklisierung. Weiterhin können die dreidimensionalen Strukturen bei der Entwicklung neuer Liganden oder Inhibitoren für diese Enzyme hilfreich sein und dementsprechend verschiedene metabolische Wege in Pflanzen, Tieren oder Bakterien beeinflussen.

5. Literaturverzeichnis

- [1] Kohn,W. (1999) Nobel Lecture: Electronic structure of matter-wave functions and density functionals. *Reviews of Modern Physics*, **71**, 1253-1266.
- [2] Pople,J.A. (1999) Quantum chemical models (Nobel lecture). *Angewandte Chemie-International Edition*, **38**, 1894-1902.
- [3] Krieger,E., Nabuurs,S.B., & Vriend,G. (2003) Homology modeling. *Methods Biochem Anal.*, **44**, 509-523.
- [4] Liang,P.H., Ko,T.P., & Wang,A.H.J. (2002) Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *European Journal of Biochemistry*, **269**, 3339-3354.
- [5] Ruzicka,L. (1953) The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds. *Experientia*, **9**, 357-367.
- [6] Goodwin,T.W. (1977) *The prenyllipids of the membranes of higher plants - In: Lipid and Lipid Polymers of Higher Plants*. Springer Verlag, Berlin.
- [7] Bloch,K., Chaykin,S., Phillips,A.H., & De Waard,A. (1959) Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate. *J Biol Chem*, **234**, 2595-2604.
- [8] Lynen,F., Eggerer,H., Henning,U., & Kessel,I. (1958) Farnesyl-pyrophosphat und 3-Methyl- Δ^3 -butenyl-1-pyrophosphat, die biologischen Vorstufen des Squalens. *Angewandte Chemie-International Edition*, **70**, 738-742.
- [9] Lichtenthaler,H.K., Rohmer,M., & Schwender,J. (1997) Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants. *Physiologia Plantarum*, **101**, 643-652.
- [10] Schopfer,P. & Brennicke,A. (1999) *Pflanzenphysiologie*. Springer Verlag Berlin.
- [11] Henning,U., Moslein,E.M., & Lynen,F. (1959) Biosynthesis of terpenes. V. Formation of 5-pyrophosphomevalonic acid by phosphomevalonic kinase. *Arch Biochem Biophys.*, **83**, 259-267.
- [12] Chappell,J. (1995) Biochemistry and Molecular-Biology of the Isoprenoid Biosynthetic-Pathway in Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, **46**, 521-547.
- [13] Mcgarvey,D.J. & Croteau,R. (1995) Terpenoid Metabolism. *Plant Cell*, **7**, 1015-1026.
- [14] Vollack,K.U. & Bach,T.J. (1996) Cloning of a cDNA encoding cytosolic acetoacetyl-coenzyme A thiolase from radish by functional expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiology*, **111**, 1097-1107.

-
- [15] Montamat,F., Guilloton,M., Karst,F., & Delrot,S. (1995) Isolation and characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A synthase. *Gene*, **167**, 197-201.
- [16] Lluch,M.A., Masferrer,A., Arro,M., Boronat,A., & Ferrer,A. (2000) Molecular cloning and expression analysis of the mevalonate kinase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, **42**, 365-376.
- [17] Cordier,H., Karst,F., & Berges,T. (1999) Heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* of an *Arabidopsis thaliana* cDNA encoding mevalonate diphosphate decarboxylase. *Plant Molecular Biology*, **39**, 953-967.
- [18] Schulte,A.E., van der Heijden,R., & Verpoorte,R. (1999) Purification and characterization of phosphomevalonate kinase from *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, **52**, 975-983.
- [19] Bach,T.J., Boronat,A., Campos,N., Ferrer,A., & Vollack,K.U. (1999) Mevalonate biosynthesis in plants. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, **34**, 107-122.
- [20] Bach,T.J. (1995) Some New Aspects of Isoprenoid Biosynthesis in Plants - A Review. *Lipids*, **30**, 191-202.
- [21] Gray,J.C. (1987) Control of Isoprenoid Biosynthesis in Higher-Plants. *Advances in Botanical Research Incorporating Advances in Plant Pathology*, **14**, 25-91.
- [22] Rohmer,M., Knani,M., Simonin,P., Sutter,B., & Sahn,H. (1993) Isoprenoid Biosynthesis in Bacteria - A Novel Pathway for the Early Steps Leading to Isopentenyl Diphosphate. *Biochemical Journal*, **295**, 517-524.
- [23] Rodriguez-Concepcion,M. & Boronat,A. (2002) Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. A metabolic milestone achieved through genomics. *Plant Physiology*, **130**, 1079-1089.
- [24] Brandt,W., Dessoy,M.A., Fulhorst,M., Gao,W., Zenk,M.H., & Wessjohann,L.A. (2004) A proposed mechanism for the reductive ring opening of the cyclodiphosphate MEcPP, a crucial transformation in the new DXP/MEP pathway to isoprenoids based on modeling studies and feeding experiments. *Chembiochem*, **5**, 311-323.
- [25] Crane,C.M., Kaiser,J., Ramsden,N.L., Lauw,S., Rohdich,F., Eisenreich,W., Hunter,W.N., Bacher,A., & Diederich,F. (2006) Fluorescent inhibitors for IspF, an enzyme in the non-mevalonate pathway for isoprenoid biosynthesis and a potential target for antimalarial therapy. *Angew. Chem Int Ed Engl.*, **45**, 1069-1074.
- [26] Wessjohann,L. & Sontag,B. (1996) Prenylation of benzoic acid derivatives catalyzed by a transferase from *Escherichia coli* overproduction: Method development and substrate specificity. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, **35**, 1697-1699.
- [27] Kuzuyama,T., Noel,J.P., & Richard,S.B. (2005) Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature*, **435**, 983-987.
-

-
- [28] Ashby,M.N., Kutsunai,S.Y., Ackerman,S., Tzagoloff,A., & Edwards,P.A. (1992) Coq2 Is A Candidate for the Structural Gene Encoding Para-Hydroxybenzoate - Polyprenyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, **267**, 4128-4136.
- [29] Song,L.S. & Poulter,C.D. (1994) Yeast Farnesyl-Diphosphate Synthase - Site-Directed Mutagenesis of Residues in Highly Conserved Prenyltransferase Domain-I and Domain-Ii. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 3044-3048.
- [30] Young,I.G., Gibson,F., Leppik,R.A., & Hamilton,J.A. (1972) Biochemical and Genetic Studies on Ubiquinone Biosynthesis in Escherichia-Coli K-12 - 4-Hydroxybenzoate Octaprenyltransferase. *Journal of Bacteriology*, **110**, 18-&.
- [31] Nishimura,K., Nakahigashi,K., & Inokuchi,H. (1992) Location of the Ubia Gene on the Physical Map of Escherichia-Coli. *Journal of Bacteriology*, **174**, 5762.
- [32] Nichols,B.P. & Green,J.M. (1992) Cloning and Sequencing of Escherichia-Coli-Ubic and Purification of Chorismate Lyase. *Journal of Bacteriology*, **174**, 5309-5316.
- [33] Siebert,M., Bechthold,A., Melzer,M., May,U., Berger,U., Schroder,G., Schroder,J., Severin,K., & Heide,L. (1992) Ubiquinone Biosynthesis - Cloning of the Genes-Coding for Chorismate Pyruvate-Lyase and 4-Hydroxybenzoate Octaprenyl Transferase from Escherichia-Coli. *Febs Letters*, **307**, 347-350.
- [34] Wessjohann,L.A., Sonntag,B., & Dessoy,M.A. (1999) *Enzymatic C-C coupling: the development of aromatic prenylation for organic synthesis - In: Bioorganic chemistry - reviews and perspectives*. Wiley-VCH.
- [35] Wendt,K.U., Poralla,K., & Schulz,G.E. (1997) Structure and function of a squalene cyclase. *Science*, **277**, 1811-1815.
- [36] Lucker,J., El Tamer,M.K., Schwab,W., Verstappen,F.W.A., van der Plas,L.H.W., Bouwmeester,H.J., & Verhoeven,H.A. (2002) Monoterpene biosynthesis in lemon (Citrus limon) - cDNA isolation and functional analysis of four monoterpene synthases. *European Journal of Biochemistry*, **269**, 3160-3171.
- [37] Schwab,W., Williams,D.C., Davis,E.M., & Croteau,R. (2001) Mechanism of monoterpene cyclization: Stereochemical aspects of the transformation of noncyclizable substrate analogs by recombinant (-)-limonene synthase, (+)-bornyl diphosphate synthase, and (-)-pinene synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **392**, 123-136.
- [38] Hyatt,D.C. & Croteau,R. (2005) Mutational analysis of a monoterpene synthase reaction: Altered catalysis through directed mutagenesis of (-)-pinene synthase from *Abies grandis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **439**, 222-233.
- [39] Munck,S.L. & Croteau,R. (1990) Purification and Characterization of the Sesquiterpene Cyclase Patchoulol Synthase from *Pogostemon-Cablin*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **282**, 58-64.
-

-
- [40] Ogura,K. (1991) Studies on Polyprenyl Diphosphate Synthases. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **201**, 91-BIOT.
- [41] Tarshis,L.C., Proteau,P.J., Kellogg,B.A., Sacchettini,J.C., & Poulter,C.D. (1996) Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 15018-15023.
- [42] Ohnuma,S.I., Nakazawa,T., Hemmi,H., Hallberg,A.M., Koyama,T., Ogura,K., & Nishino,T. (1996) Conversion from farnesyl diphosphate synthase to geranylgeranyl diphosphate synthase by random chemical mutagenesis. *Journal of Biological Chemistry*, **271**, 10087-10095.
- [43] Pan,J.J., Yang,L.W., & Liang,P.H. (2000) Effect of site-directed mutagenesis of the conserved aspartate and glutamate on E-coli undecaprenyl pyrophosphate synthase catalysis. *Biochemistry*, **39**, 13856-13861.
- [44] Poulter,C.D. & Rilling,H.C. (1978) Prenyl Transfer-Reaction - Enzymatic and Mechanistic Studies of 1'-4 Coupling Reaction in Terpene Biosynthetic-Pathway. *Accounts of Chemical Research*, **11**, 307-313.
- [45] Tholl,D., Croteau,R., & Gershenzon,J. (2001) Partial purification and characterization of the short-chain prenyltransferases, geranyl diphosphate synthase and farnesyl diphosphate synthase, from *Abies grandis* (grand fir). *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **386**, 233-242.
- [46] Pylypenko,O., Rak,A., Reents,R., Niculae,A., Sidorovitch,V., Cioaca,M.D., Bessolitsyna,E., Thoma,N.H., Waldmann,H., Schlichting,I., Goody,R.S., & Alexandrov,K. (2003) Structure of Rab escort protein-1 in complex with Rab geranylgeranyltransferase. *Mol Cell*, **11**, 483-494.
- [47] Long,S.B., Casey,P.J., & Beese,L.S. (1998) Cocystal structure of protein farnesyltransferase complexed with a farnesyl diphosphate substrate. *Biochemistry*, **37**, 9612-9618.
- [48] Saderholm,M.J., Hightower,K.E., & Fierke,C.A. (2000) Role of metals in the reaction catalyzed by protein farnesyltransferase. *Biochemistry*, **39**, 12398-12405.
- [49] Maurer-Stroh,S., Washietl,S., & Eisenhaber,F. (2003) Protein prenyltransferases. *Genome Biology*, **4**.
- [50] Roskoski,R. (2003) Protein prenylation: a pivotal posttranslational process. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **303**, 1-7.
- [51] Fu,H.W. & Casey,P.J. (1999) Enzymology and biology of CaaX protein prenylation. *Recent Prog. Horm. Res*, **54**, 315-342.
- [52] Omer,C.A., Kral,A.M., Diehl,R.E., Prendergast,G.C., Powers,S., Allen,C.M., Gibbs,J.B., & Kohl,N.E. (1993) Characterization of Recombinant Human Farnesyl-Protein Transferase - Cloning, Expression, Farnesyl Diphosphate Binding, and Functional Homology with Yeast Prenyl-Protein Transferases. *Biochemistry*, **32**, 5167-5176.
-

-
- [53] Günnewich,N. (2003) Expression und Charakterisierung von Terpensynthasen und Prenyltransferasen aus *Cannabis sativa* L., Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, Diplomarbeit
- [54] Allinger,N.L. & Lii,J.H. (1987) Benzene, Aromatic Rings, Vanderwaals Molecules, and Crystals of Aromatic-Molecules in Molecular Mechanics (Mm3). *Journal of Computational Chemistry*, **8**, 1146-1153.
- [55] Berendsen,H.J.C., Vanderspoel,D., & Vandrunen,R. (1995) Gromacs - A Message-Passing Parallel Molecular-Dynamics Implementation. *Computer Physics Communications*, **91**, 43-56.
- [56] Brooks,B.R., Bruccoleri,R.E., Olafson,B.D., States,D.J., Swaminathan,S., & Karplus,M. (1983) Charmm - A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *Journal of Computational Chemistry*, **4**, 187-217.
- [57] Clark,M., Cramer,R.D., & Vanopdenbosch,N. (1989) Validation of the General-Purpose Tripos 5.2 Force-Field. *Journal of Computational Chemistry*, **10**, 982-1012.
- [58] Halgren,T.A. (1996) Merck molecular force field .1. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, **17**, 490-519.
- [59] Jorgensen,W.L. & Tirado-Rives,J. (1998) Development of the OPLS-AA force field for organic and biomolecular systems. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society*, **216**, U696.
- [60] Weiner,S.J., Kollman,P.A., Case,D.A., Singh,U.C., Ghio,C., Alagona,G., Profeta,S., & Weiner,P. (1984) A New Force-Field for Molecular Mechanical Simulation of Nucleic-Acids and Proteins. *Journal of the American Chemical Society*, **106**, 765-784.
- [61] Stewart,J.J.P. (1991) Optimization of Parameters for Semiempirical Methods 3. Extension of Pm3 to Be, Mg, Zn, Ga, Ge, As, Se, Cd, In, Sn, Sb, Te, Hg, Tl, Pb, and Bi. *Journal of Computational Chemistry*, **12**, 320-341.
- [62] Mulholland,A.J. (2005) Modelling enzyme reaction mechanisms, specificity and catalysis. *Drug Discovery Today*, **10**, 1393-1402.
- [63] Berman,H.M., Westbrook,J., Feng,Z., Gilliland,G., Bhat,T.N., Weissig,H., Shindyalov,I.N., & Bourne,P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, **28**, 235-242.
- [64] Bairoch,A. & Apweiler,R. (2000) The SWISS-PROT protein sequence database and its supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Research*, **28**, 45-48.
- [65] Schomburg,I., Chang,A., & Schomburg,D. (2002) BRENDA, enzyme data and metabolic information. *Nucleic Acids Research*, **30**, 47-49.
- [66] Chou,P.Y. & Fasman,G.D. (1974) Prediction of Protein Conformation. *Biochemistry*, **13**, 222-245.
-

-
- [67] Garnier,J., Osguthorpe,D.J., & Robson,B. (1978) Analysis of Accuracy and Implications of Simple Methods for Predicting Secondary Structure of Globular Proteins. *Journal of Molecular Biology*, **120**, 97-120.
- [68] King,R.D. & Sternberg,M.J.E. (1990) Machine Learning Approach for the Prediction of Protein Secondary Structure. *Journal of Molecular Biology*, **216**, 441-457.
- [69] Kelley,L.A., MacCallum,R.M., & Sternberg,M.J.E. (2000) Enhanced genome annotation using structural profiles in the program 3D-PSSM. *Journal of Molecular Biology*, **299**, 499-520.
- [70] Rost,B., Yachdav,G., & Liu,J.F. (2004) The PredictProtein server. *Nucleic Acids Research*, **32**, W321-W326.
- [71] Krogh,A., Larsson,B., von Heijne,G., & Sonnhammer,E.L.L. (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *Journal of Molecular Biology*, **305**, 567-580.
- [72] Dayhoff,M.O., Orcutt B.C., & Schwartz R. (1978) Atlas of protein sequence and structure. *Ed. M. O. Dayhoff*.
- [73] Henikoff,S. & Henikoff,J.G. (1992) Amino-Acid Substitution Matrices from Protein Blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **89**, 10915-10919.
- [74] Corpet,F. (1988) Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*, **16**, 10881-10890.
- [75] Altschul,S.F., Gish,W., Miller,W., Myers,E.W., & Lipman,D.J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**, 403-410.
- [76] Levitt,M. (1992) Accurate Modeling of Protein Conformation by Automatic Segment Matching. *Journal of Molecular Biology*, **226**, 507-533.
- [77] Laskowski,R.A., Macarthur,M.W., Moss,D.S., & Thornton,J.M. (1993) Procheck - A Program to Check the Stereochemical Quality of Protein Structures. *Journal of Applied Crystallography*, **26**, 283-291.
- [78] Anfinsen,C.B. (1972) The formation and stabilization of protein structure. *Biochem J*, **128**, 737-749.
- [79] Sippl,M.J. (1990) Calculation of Conformational Ensembles from Potentials of Mean Force - An Approach to the Knowledge-Based Prediction of Local Structures in Globular-Proteins. *Journal of Molecular Biology*, **213**, 859-883.
- [80] Wang,R.X., Liu,L., Lai,L.H., & Tang,Y.Q. (1998) SCORE: A new empirical method for estimating the binding affinity of a protein-ligand complex. *Journal of Molecular Modeling*, **4**, 379-394.
- [81] Khorana,H.G. (1968) Synthetic nucleic acids and the genetic code. *JAMA*, **206**, 1978-1982.
-

-
- [82] Kleppe,K., Ohtsuka,E., Kleppe,R., Molineux,I., & Khorana,H.G. (1971) Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*, **56**, 341-361.
- [83] Mullis,K., Faloona,F., Scharf,S., Saiki,R., Horn,G., & Erlich,H. (1986) Specific Enzymatic Amplification of Dna In Vitro - the Polymerase Chain-Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, **51**, 263-273.
- [84] Sanger,F., Nicklen,S., & Coulson,A.R. (1977) Dna Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **74**, 5463-5467.
- [85] Wiechelman,K.J., Braun,R.D., & Fitzpatrick,J.D. (1988) Investigation of the Bicinchoninic Acid Protein Assay - Identification of the Groups Responsible for Color Formation. *Analytical Biochemistry*, **175**, 231-237.
- [86] Maniatis,T., Fritsch,E.F., & Sambrook,J. (1982) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [87] Ausubel et al. (1999) *Current protocols in molecular biology*. Harvard Medical School.
- [88] Melzer,M. & Heide,L. (1994) Characterization of Polyprenyldiphosphate-4-Hydroxybenzoate Polyprenyltransferase from Escherichia-Coli. *Biochimica et Biophysica Acta-Lipids and Lipid Metabolism*, **1212**, 93-102.
- [89] Altschul,S.F. & Lipman,D.J. (1990) Protein Database Searches for Multiple Alignments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **87**, 5509-5513.
- [90] Deisenhofer,J., Epp,O., Sinning,I., & Michel,H. (1995) Crystallographic Refinement at 2.3-Angstrom Resolution and Refined Model of the Photosynthetic Reaction-Center from Rhodospseudomonas-Viridis. *Journal of Molecular Biology*, **246**, 429-457.
- [91] Fu,D.X., Libson,A., Miercke,L.J.W., Weitzman,C., Nollert,P., Krucinski,J., & Stroud,R.M. (2000) Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science*, **290**, 481-486.
- [92] Fulhorst,M. (2003) Prenyltransferases as potential biocatalysts: substrate and inhibitor studies on p-Hydroxybenzoate Oligoprenyltransferase from E. coli, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, Dissertation
- [93] Goldgur,Y., Dyda,F., Hickman,A.B., Jenkins,T.M., Craigie,R., & Davies,D.R. (1998) Three new structures of the core domain of HIV-1 integrase: An active site that binds magnesium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 9150-9154.
- [94] Kunkel,T.A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad Sci U. S A*, **82**, 488-492.
-

-
- [95] Ke,S.H. & Madison,E.L. (1997) Rapid and efficient site-directed mutagenesis by single-tube 'megaprimer' PCR method. *Nucleic Acids Research*, **25**, 3371-3372.
- [96] Tyagi,R., Lai,R., & Duggleby,R.G. (2004) A new approach to 'megaprimer' polymerase chain reaction mutagenesis without an intermediate gel purification step. *Bmc Biotechnology*, **4**.
- [97] Takagi,M., Nishioka,M., Kakihara,H., Kitabayashi,M., Inoue,H., Kawakami,B., Oka,M., & Imanaka,T. (1997) Characterization of DNA polymerase from *Pyrococcus* sp. strain KOD1 and its application to PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 4504-4510.
- [98] Zakharova,S. (2005) Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle-Saale, persönliche Kommunikation
- [99] Momose,K. & Rudney,H. (1972) 3-Polyprenyl-4-Hydroxybenzoate Synthesis in Inner Membrane of Mitochondria from Para Hydroxybenzoate and Isopentenylpyrophosphate - Demonstration of Isoprenoid Synthesis in Rat-Liver Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, **247**, 3930-&.
- [100] Schierhorn,A. (2004) Martin-Luther-Universität Halle, Fachbereich Biochemie / Biotechnologie, persönliche Kommunikation
- [101] Yazaki,K. (2006) Molecular & Cellular Biology of Totipotency, Div. of Integrated Life Science, Kyoto University, Kyoto, Japan, persönliche Kommunikation
- [102] Brandt,W. (2006) Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, persönliche Kommunikation
- [103] Lizermann,L.L. (2004) *Der Cannabis Anbau : Alles über Botanik, Anbau, Vermehrung, Weiterverarbeitung und medizinische Anwendung sowie THC-Messverfahren*.
- [104] Starks,C.M., Back,K.W., Chappell,J., & Noel,J.P. (1997) Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase. *Science*, **277**, 1815-1820.
- [105] Whittington,D.A., Wise,M.L., Urbansky,M., Coates,R.M., Croteau,R.B., & Christianson,D.W. (2002) Bornyl diphosphate synthase: Structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **99**, 15375-15380.
- [106] Koshland,D.E. (1995) The Key-Lock Theory and the Induced Fit Theory. *Angewandte Chemie-International Edition*, **33**, 2375-2378.
- [107] Cheng,W.C., Chang,Y.N., & Wang,W.C. (2005) Structural basis for shikimate-binding specificity of *Helicobacter pylori* shikimate kinase. *Journal of Bacteriology*, **187**, 8156-8163.
-

-
- [108] Suryadi,J., Tran,E.J., Maxwell,E.S., & Brown,B.A. (2005) The crystal structure of the Methanocaldococcus jannaschii multifunctional L7Ae RNA-binding protein reveals an induced-fit interaction with the box C/D RNAs. *Biochemistry*, **44**, 9657-9672.
- [109] Weber,R. (2005) Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle-Saale, persönliche Kommunikation
- [110] Hans,J., Brandt,W., & Vogt,T. (2004) Site-directed mutagenesis and protein 3D-homology modelling suggest a catalytic mechanism for UDP-glucose-dependent betanidin 5-O-glucosyltransferase from *Dorotheanthus bellidiformis*. *Plant J*, **39**, 319-333.
- [111] Barth,A., Frost,K., Wahab,M., Brandt,W., Schadler,H.D., & Franke,R. (1994) Classification of serine proteases derived from steric comparisons of their active sites, part II: "Ser, His, Asp arrangements in proteolytic and nonproteolytic proteins". *Drug Des Discov.*, **12**, 89-111.
- [112] Brandt,W., Ludwig,O., Thondorf,I., & Barth,A. (1996) A new mechanism in serine proteases catalysis exhibited by dipeptidyl peptidase IV (DP IV) - Results of PM3 semiempirical thermodynamic studies supported by experimental results. *European Journal of Biochemistry*, **236**, 109-114.
- [113] Lesburg,C.A., Zhai,G., Cane,D.E., & Christianson,D.W. (1997) Crystal structure of pentalenene synthase: mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology. *Science*, **277**, 1820-1824.

6. Anhang

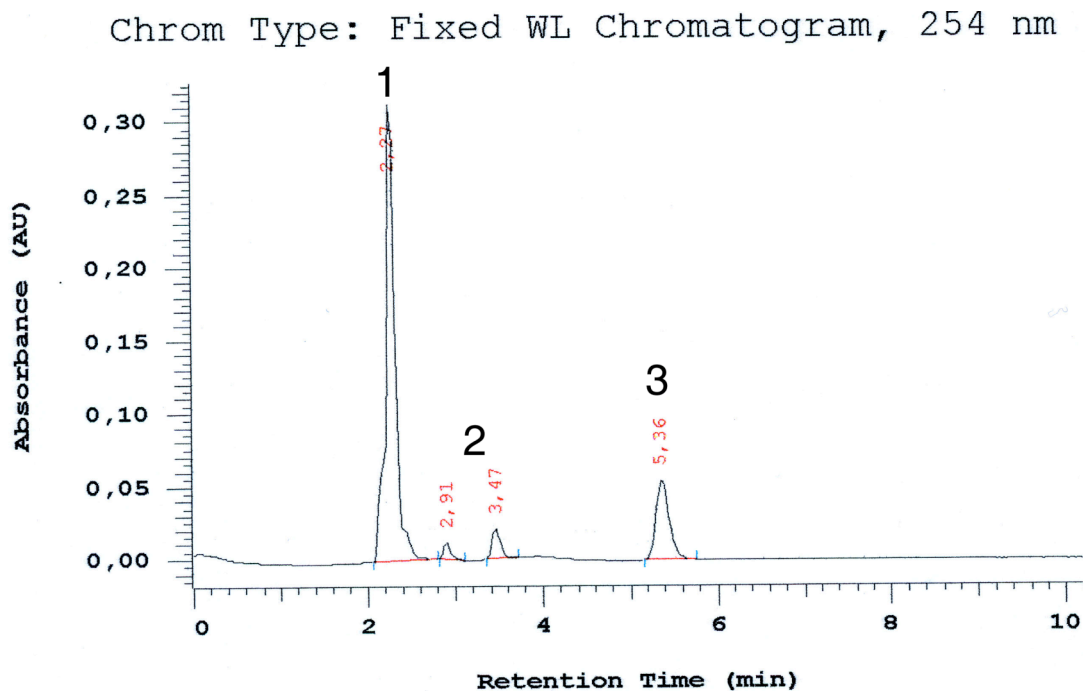


Abbildung 33: Analytisches HPLC-Spektrum des Geranyldiphosphat-Assays für das unmodifizierte ubiA-Enzym. Ein signifikanter Peak bei 5,36 min entspricht 3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure. (1) – Interner Standard (*para*-Hydroxy-biphenyl); (2) – Verunreinigungen; (3) – Produkt, 3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure.

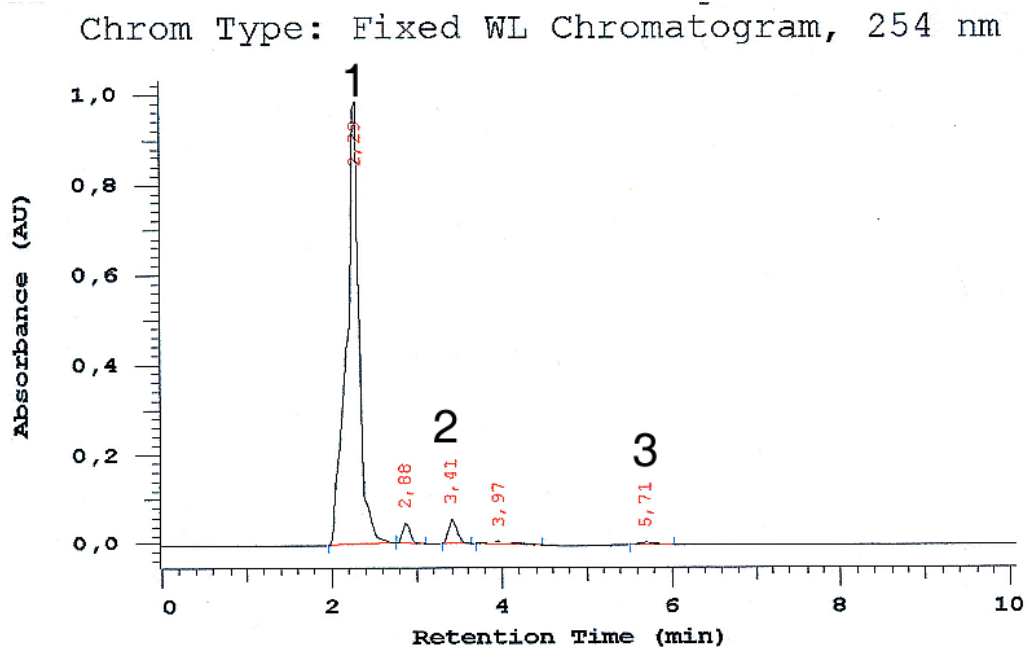


Abbildung 34: Analytisches HPLC-Spektrum des Geranyldiphosphat-Assays für R137A. Ein sehr kleiner Peak bei 5,71 min deutet auf gebildetes Produkt hin (3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure). Nach Integration der Peakflächen ergab sich eine 90%ige Verringerung der Aktivität im Vergleich zum unmodifizierten ubiA-Enzym (Abbildung 33). (1) – Interner Standard (*para*-Hydroxy-biphenyl); (2) – Verunreinigungen; (3) – Produkt, 3-Geranyl-4-hydroxybenzoesäure

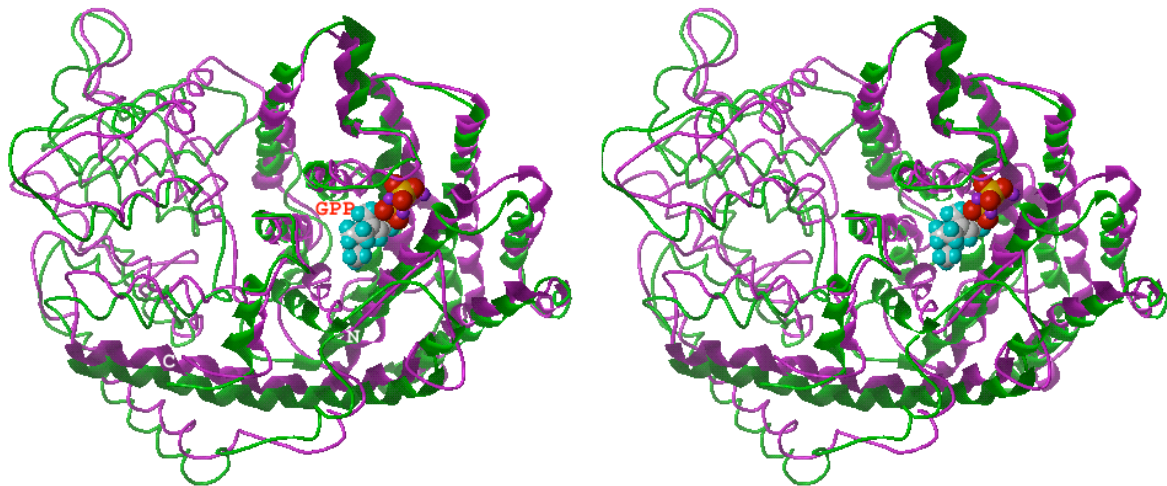


Abbildung 35: Stereoabbildung der überlagerten *Cannabis sativa* Terpensynthasen mit gedocktem Geranyldiphosphat. Die katalytisch aktive C-terminale Domäne ist verstärkt dargestellt, wohingegen die N-terminale Region lediglich als Linie abgebildet ist. (-)-Limonen-Synthase – magenta. (+)- α -Pinen-Synthase (grün)

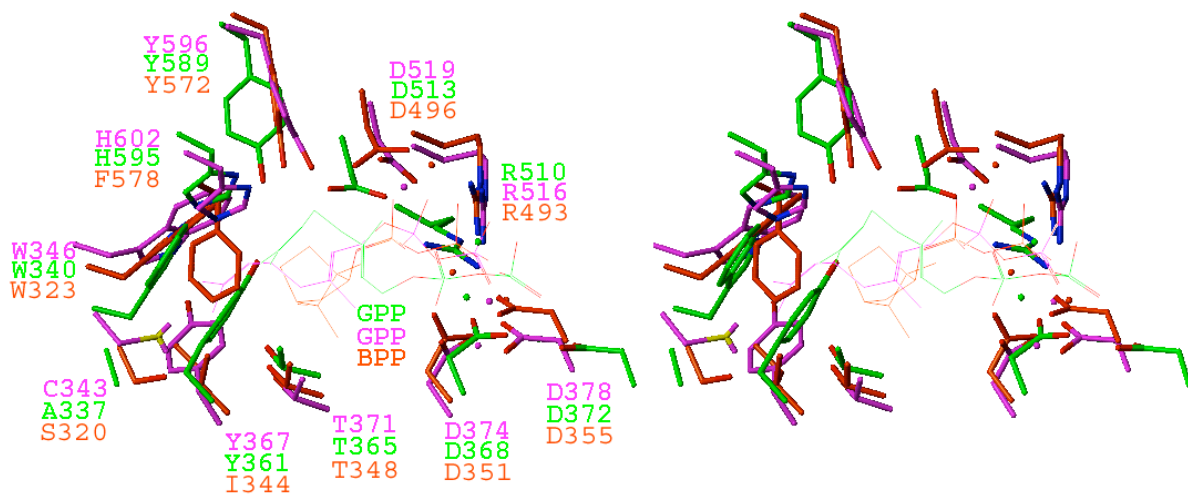


Abbildung 36: Stereoabbildung der überlagerten Aminosäurereste in den möglichen aktiven Zentren von CsTps1 (magenta) und CsTps2 (grün), sowie dem aktiven Zentrum der Kristallstruktur von (+)-Bornyldiphosphat Synthase (rot-orange). Als Liganden sind Geranyldiphosphat, respektive (+)-Bornyldiphosphat dargestellt. Nicht essentielle Wasserstoffe sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht abgebildet.

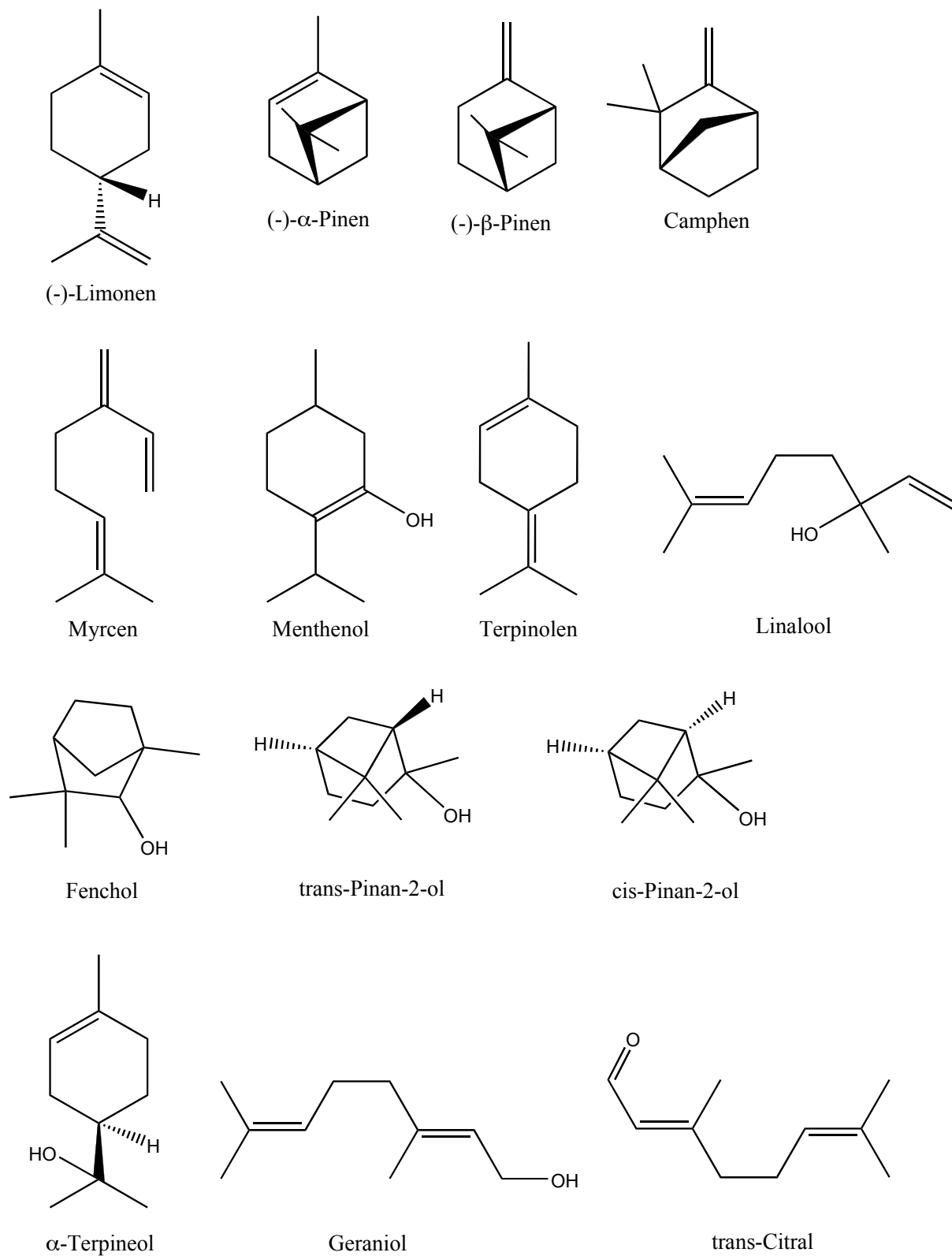


Abbildung 37: Strukturen der in Tabelle 8 aufgeführten Monoterpene, welche nach der Produktanalyse über GC-MS-Analysen ermittelt werden konnten.

Erklärung

Hiermit erkläre ich ausdrücklich, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst habe und mich dabei keiner anderen, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Oppin, den

Lars Bräuer

CURRICULUM VITAE – LARS BRÄUER

PERSÖNLICHE DATEN

Geburtsdatum:	25.02.1977
Geburtsort:	Annaberg-Buchholz, Deutschland
Familienstand:	verheiratet
Sprachen:	Deutsch (Muttersprache), Englisch sehr gut, Schulkenntnisse in Russisch

AUSBILDUNG

seit 07/2002	Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle, Promotionsarbeit auf dem Gebiet „prenylierender Enzyme“, geplanter Abschluss der Dissertation März/April 2006
09/1996-05/2002	Universität Halle-Wittenberg, Studium der Biochemie, Schwerpunkt: Klinische Mikrobiologie, Abschluss mit Diplomverteidigung, Thema der Diplomarbeit im Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie: „Modellierung der 4-Hydroxybenzoat Oligoprenyltransferase und Charakterisierung potentiell aktiver Zentren“ – Prädikat „sehr gut“
09/1993-07/1996	Wirtschaftsgymnasium in Annaberg-Buchholz mit den Schwerpunkten: VWL / BWL und betriebliches Rechnungswesen, Abschluss mit <i>allgemeiner Hochschulreife</i>
09/1983-08/1993	Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule in Annaberg-Buchholz, Abschluss mit <i>mittlerer Reife</i>

PUBLIKATIONEN

2004	Bräuer L, Brandt W, Wessjohann LA., „Modeling the <i>E. coli</i> 4-hydroxybenzoic acid oligoprenyltransferase (ubiA transferase) and characterization of potential active sites“, <i>J. Mol. Model.</i> (2004), 10, 317-27
2005	PDB-Eintrag und entsprechende Publikation zu einer Terpensynthese aus <i>Cannabis sativa</i> (Veröffentlichung vor. 07/2006)
2006	Bräuer L, Zakharova S, Wessjohann LA, „Mutational Analysis of the <i>E. coli</i> ubiA-enzyme“, Manuskript liegt vor Bräuer L, Weber R, Brandt W, Wessjohann LA, Kutchan T, „Modeling and Mutational Analysis of a <i>Cannabis sativa</i> terpene synthase“, Manuskript in Arbeit

WEITERE

**Vorträge und Poster
bei folgenden
Veranstaltungen und
Konferenzen zum ubiA-
Enzym aus *E. coli***

Summer School Medicinal Chemistry,
Shanghai / China, 2005

Annual Meeting – GDCh / DPhG, Frontiers in Medicinal
Chemistry, Uni **Leipzig, 2005**

MGMS Meeting Membranes and Membrane Proteins,
St. Catherine's College, **Oxford, 2005**

Annual Molecular Modelling Workshop, **Erlangen, 2003**

Fränkisch-Mitteldeutsches Naturstoffchemikertreffen
Halle, 2003

Workshop-Biozentrum, **Halle, 2003**

Kurt-Mothes Doktorandenworkshop (MPI **Jena**), 2002