

**Analyse der strukturellen Voraussetzungen
des Reaktionsmechanismus der
Multiprodukt-Terpensynthese TPS10 aus Mais**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Martin-Luther-Universität Halle/ Wittenberg

von

Marko Walkowiak

geboren am 05. Oktober 1982 in Blankenburg

Halle, im Dezember 2014

Gutachter:

1. Prof. Jörg Degenhardt
2. PD Dr. Wolfgang Brandt
3. Prof. Dorothea Tholl

Tag der öffentlichen Verteidigung:

11. August 2016

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
a.dest.	destilliertes Wasser
APS	Ammoniumpersulfat
Ap ^r	Ampicillinresistenz
ara	Arabinose
ATP	Adenosintri-phosphat
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
bp	Basenpaar
cDNA	“copy DNA”
Cm ^r	Chloramphenicolresistenz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EST	“expressed sequenz tag”
FID	Flammenionisierungsdetektor
FPP	Farnesylpyrophosphat
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
gDNA	genomische DNA
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
IPP	Isopentenylpyrophosphat
Km ^r	Kanamycinresistenz
kb	Kilobasen
MCS	„multiple cloning site“
MES	Morpholinethansulfonsäure

MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PDB	Protein Data Base / Proteindatenbank
PCR	„polymerase chain reaction“
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	„reverse transcriptase PCR“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDM	„Site Directed Mutagenesis“
SPME	Festphasenmikroextraktion („solid phasemicro extraction“)
STKW	Sesquiterpenkohlenwasserstoff
STPS	Sesquiterpensynthesen
TE	TE-Puffer
TIC	„total ion chromatogram“
UV	ultraviolett
www	„world wide web“

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Betrachtungen zu Terpenen	1
1.2.	Übersicht der Biosynthesewege heterogenen Ursprungs	7
1.2.1	Allgemein Terpenbiosynthese.....	7
1.2.2	Struktur und Reaktionsmechanismen von Terpensynthasen	8
1.2.3	Terpensynthasen sind oft Multiproduktenzyme.....	10
1.3	Ziel dieser Arbeit.....	13
2	Material und Methoden	14
2.1	Mikrobiologische Methoden	14
2.1.1	Bakterienstämme.....	14
2.1.2	Antibiotika	14
2.1.3	Medien	14
2.1.4	Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien	15
2.1.5.	Transformation von <i>E.coli</i>	15
2.2.	Nukleinsäureisolierung	15
2.2.1.	Plasmidisolierung aus <i>E.coli</i>	15
2.3	DNA-Techniken	16
2.3.1	Oligonukleotide	16
2.3.2	PCR als Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten	16
2.3.3	Restriktion von DNA für spätere Klonierung.....	17
2.3.4	Ligation von amplifizierter- und Plasmid-DNA.....	17
2.3.5.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen.....	17
2.3.6.	Klonierung von DNA-Fragmenten.....	17
2.3.7	Gerichtete Mutagenese	18
2.3.8	Sequenzierung von DNA.....	19
2.3.9	DNA/ Protein Sequenzanalyse und Recherche	19
2.4	Elektrophorese und Transfertechniken.....	19
2.4.1	DNA-Agarosegelelektrophorese	19
2.4.2	SDS-PAGE	20
2.4.3	Protein-Transferblot/ Western-Blot	20
2.4.4	Hybridisierung von AK-gestützten Markern.....	21
2.5	Proteintechniken.....	21
2.5.1	Synthese (Expression) rekombinanter Proteine.....	21

2.5.2	Affinitätschromatische Proteinreinigung	22
2.5.3	Proteinquantifizierung.....	23
2.5.4	Computergestützte Bestimmung des Molekulargewichts	24
2.5.5	Aktivitätsbestimmung	24
2.5.6	GC/MS GC/FID von Terpenen.....	25
2.5.7	Terpenidentifizierung.....	26
2.5.8	Computergestützte Proteinstrukturanalyse	26
2.5.9	Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung denaturierter Proteine.....	28
2.6	Statistische Methoden	28
2.7	Amerkungen	29
3	Ergebnisse.....	30
3.1	Allgemein TPS10.....	30
3.1.1	Einordnung TPS10	30
3.1.2	Computergestützte Proteinanalyse.....	39
3.2	Struktur-Funktionsanalyse	46
3.2.1	Strukturelle Untersuchung der N- und C-terminalen Enden	48
3.2.2	Die Funktion von Aminosäuren im äußeren aktiven Zentrum	54
3.2.3	Die Funktion von Aminosäuren im inneren aktiven Zentrum.....	62
3.3	Untersuchungen zum Einfluss der Domänen auf die Funktion von TPS10	74
4	Diskussion	76
4.1	Ein neues Modell der Isomerisierungsreaktion als Voraussetzung zur Bildung zyklischer Produkte.....	76
4.1.2	Untersuchungen der Metallbindemotive und ihrer Umgebung bei TPS10 ..	80
4.2	Stabilisierung innerhalb eines kompakten Raums führt zum enzymatischen Zwang zur Zyklisierung am Beispiel W258.....	84
4.3	Deprotonierung über SH-Gruppen.....	86
4.4	Trunkierung dienen der Klärung der Funktion des N-Terminus	88
5	Zusammenfassung	92
5	Summary	93
6	Literaturverzeichnis	94
7	Anhang.....	100
7.1	Alignment im Bereich der Metallbindemotive	100
7.2	DNA-Sequenz.....	102

1 Einleitung

1.1 Allgemeine Betrachtungen zu Terpenen

Terpene bilden aufgrund ihrer strukturellen Vielfältigkeit eine der größten Gruppen bei den Naturstoffen (Buckingham 1993). Sie kommen in verschiedenen Lebewesen wie Pflanzen, Bakterien, Pilzen und einigen wirbellosen Organismen vor, wobei der Großteil der Terpene von Pflanzen synthetisiert wird. Diese Vielfalt begeisterte viele Forscher, jedoch blieb ihnen der analytische Zugang zu diesem Wissenskontinent lange Zeit verwehrt. So wurden viele Verbindungen aus unterschiedlichen Pflanzen isoliert und entsprechend ihrer biologischen Herkunft benannt. Erst Ende des 19. Jahrhunderts erkannte Otto Wallach einen Zusammenhang zwischen den Terpenen und zeigte, dass viele von ihnen identisch waren (1884). Diese Erkenntnis gipfelte in der Isoprenregel (Wallach 1885). Diese besagt, dass alle Terpene Vielfache des Isoprens (2-Methyl-1,3-butadien) sind, d. h. sie unterscheiden sich anhand von C_5H_8 - Einheiten. Mit dieser Erkenntnis war es nun möglich, mit den üblichen Methoden zur Aufklärung der Struktur von Naturstoffen der damaligen Zeit, Elementaranalyse, Molekularrefraktion und chemischen Synthesen, die Terpene zu klassifizieren. Damit wurden 1892 die ersten neun Terpene eindeutig identifiziert und beschrieben. Für seine Verdienste erhielt Otto Wallach den Nobelpreis für Chemie (1910). Aufbauend auf Wallachs Arbeiten zeigte Leopold Ružička (Nobelpreis für Chemie 1939) die Zugehörigkeit von Verbindungen zu den Terpenen die nicht in Wallachs Schema passten. Dazu gehören z. B. Steroide wie das Lanosterin, welche ebenfalls zu den Terpenen zuzuordnen sind. Die Aufstellung der biogenetischen Isoprenregel (Ruzicka 1953) war die Folge. Darin postulierte er ein „aktives Isopren“ und die Entstehung von Carbokationen. Die Isoprene bilden durch Verknüpfung das Terpengrundgerüst und die reaktiven, carbokationischen Intermediate gehen mit der Affinität zur Bildung von Kohlenstoffringen einher. Den Beweis für das Postulat von Ružička erbrachten Feodor Lynen (Lynen et al. 1958) und Konrad Bloch (Chaykin et al. 1958) mit der parallelen Identifizierung des Isopentenylidiphosphat (IPP) als Vorstufe der Synthese von Squalen. Die Bemühungen beider Wissenschaftler wurden im Jahre 1964 mit dem Nobelpreis für Physiologie belohnt. Bis zum heutigen Tag fand man durch zahlreiche Arbeiten auf dem Gebiet der Naturstoffchemie viele weitere terpenoide Verbindungen, die wie Steroide auf Basis von Isoprenuntereinheiten entstanden sind. Damit bilden Terpene mit ca. 30000 verschiedenen Substanzen die größte Stoffklasse innerhalb der Naturstoffe (Buckingham 1993) und zeigt deren Bedeutung. Es lohnt also, sich näher damit zu beschäftigen...

Einteilung/ Klassifizierung der Terpene/ Terpenoiden

Die Definition der IUPAC zählt alle Kohlenwasserstoffstrukturen, welche sich vom Isopren ableiten, zu den Terpenen. Derivate mit Sauerstoff als Heteroatom im Ringsystem oder in vorhandenen funktionellen Gruppen gelten hingegen als Terpenoide. Diese sind in der Systematik der Organischen Chemie wiederum Teil der Lipide, wohingegen Terpene eine Untergruppe der Terpenoide darstellen. In der vorliegenden Arbeit geht es primär um Terpene und in erweiterten Betrachtungen auch um Terpenoide. Aufgrund der hohen Anzahl unterschiedlicher Verbindungen hängt die Art der Klassifizierung vom Blickwinkel des Betrachters ab. Eine chemische Einteilung der Terpenoide kann anhand der funktionellen Gruppen erfolgen und spiegelt das ganze Spektrum an Möglichkeiten des chemischen

1 Einleitung

„Modellbaukastens“ wider. Daher zählen zu den Terpenoiden Terpen-Kohlenwasserstoffe (Terpene im engeren Sinn), -Alkohole, -Ether, -Ester, -Glycoside etc. Alternative strukturelle Betrachtungen des Molekülaufbaus legen eine Einteilung anhand der Anzahl von Ringsystemen nahe (Monozyklen, Bicyklen usw.) oder man betrachtet die Art der Isoprenverknüpfung. Ein Isopren besteht im Modell aus einem Kopf, das C₁ der Isopropyl-Gruppe, und einem Schwanz, das C₄ der endständigen Methylgruppe. (Abb. 1) Die Propagation ist demnach eine Kondensationsreaktion und kann neben der Kopf-Schwanz-Verknüpfung (β -Farnesen) auch mittels Kopf-Kopf- bzw. literaturabhängig Schwanz-Schwanz-Verknüpfung (Squalen) (Hänsel-Sticher 2007) erfolgen.

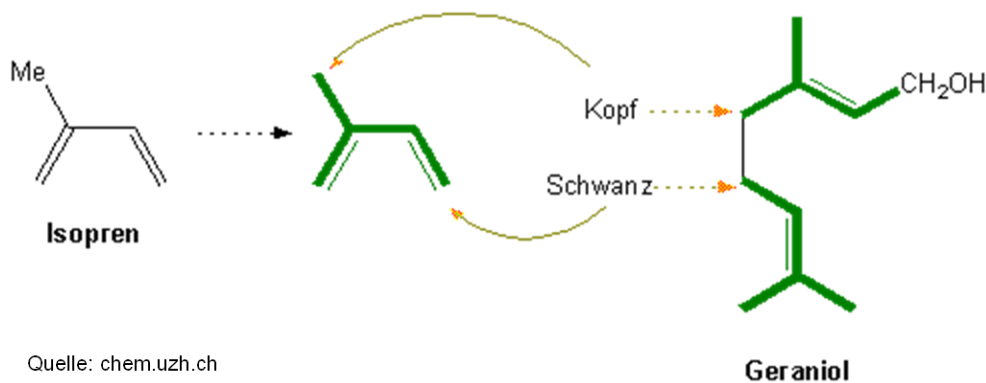


Abb. 1 Mechanistischer Überblick der Verknüpfung von Isopreneinheiten

Die Abbildung zeigt die Kopf-Schwanz-Reaktion von Isopreneinheiten (C₅). Diese 1,5-Kondensationsreaktion führt zum Geraniol (C₁₀) und nach Aktivierung zum Geranyldiphosphat (GPP). Durch die 1,5-Kondensation einer weiteren Isoprenuntereinheit an das Geraniol entsteht nach Aktivierung das Farnesyldiphosphat (FPP). Geranylgeranyldiphosphat (GGPP) entsteht dagegen durch die 5,5-Kondensation von zwei Geraniolmolekülen. Diese aktivierten Verbindungen stellen den Ausgangspunkt für die Terpenbiosynthese dar.

Für die Erstellung der vorliegenden Arbeit spielte die Einteilung von Terpenoiden/ Terpenen aufgrund der Anzahl verknüpfter Isopreneinheiten (C₅) die größte Rolle. C₅ steht für die fünf Kohlenstoffatome des Isoprens. Man unterscheidet Terpene in Hemiterpene (C₅), Monoterpene (C₁₀), Sesquiterpene (C₁₅), Diterpene (C₂₀), Sesterterpene (C₂₅), Triterpene (C₃₀), Tetraterpene (C₄₀) und Polyterpene (C_{>40}) (Abb. 2). Hemiterpene sind mit ca. 25 Verbindungen die kleinste Gruppe der Terpene und bestehen lediglich aus einer Isopreneinheit. Zu den bekanntesten gehört das Prenol und die Isovaleriansäure aus der Wurzel von *Valeriana officinalis*. Monoterpene bestehen aus 2 Isopreneinheiten und treten häufig als Bestandteil von ätherischen Ölen bei vielen Pflanzenfamilien auf. Es gibt sowohl monozyklische (Limonen, Cineol) und bicyklische (Camphan, Fenchan), als auch azyklische (Myrcen, Linalool) Verbindungen. Die aus drei Isoprenuntereinheiten aufgebauten Sesquiterpene bilden mit ca. 3000 bekannten Verbindungen eine der größten Gruppen bei den Terpenen. Das Multiproduktenzym Terpensynthase 10 des Mais bildet beispielhaft azyklische (β -Farnesen), monozyklische (β -Bisabolen) und bicyklische Sesquiterpene (α -Bergamoten) aus Farnesylpyrophosphat. Trizyklische Sesquiterpene (Hirsuten, Cedren) wurden in der Vergangenheit ebenfalls identifiziert, werden jedoch nicht von TPS10 synthetisiert. Das aus 4 Isoprenuntereinheiten bestehende Geranylgeranylpyrophosphat ist der Ausgangsstoff zur Bildung von Diterpenen, wovon ca. 5000 verschiedene Verbindungen

1 Einleitung

bekannt sind. Abietadien und Taxol bei Pflanzen sind neben dem strukturverwandten Retinol die bekanntesten Vertreter.

Sesterterpene, Triterpene und Tetraterpene sind wiederum Vielfache des Isoprens. Grundlage ist die Bildung des Ausgangssubstrats aus den Pyrophosphaten unterschiedlicher Kombinationen von Geranylpyrophosphat und Farnesylpyrophosphat, welche über Schwanz-Schwanz bzw. Kopf-Schwanz Reaktionen s. o. verknüpft werden.

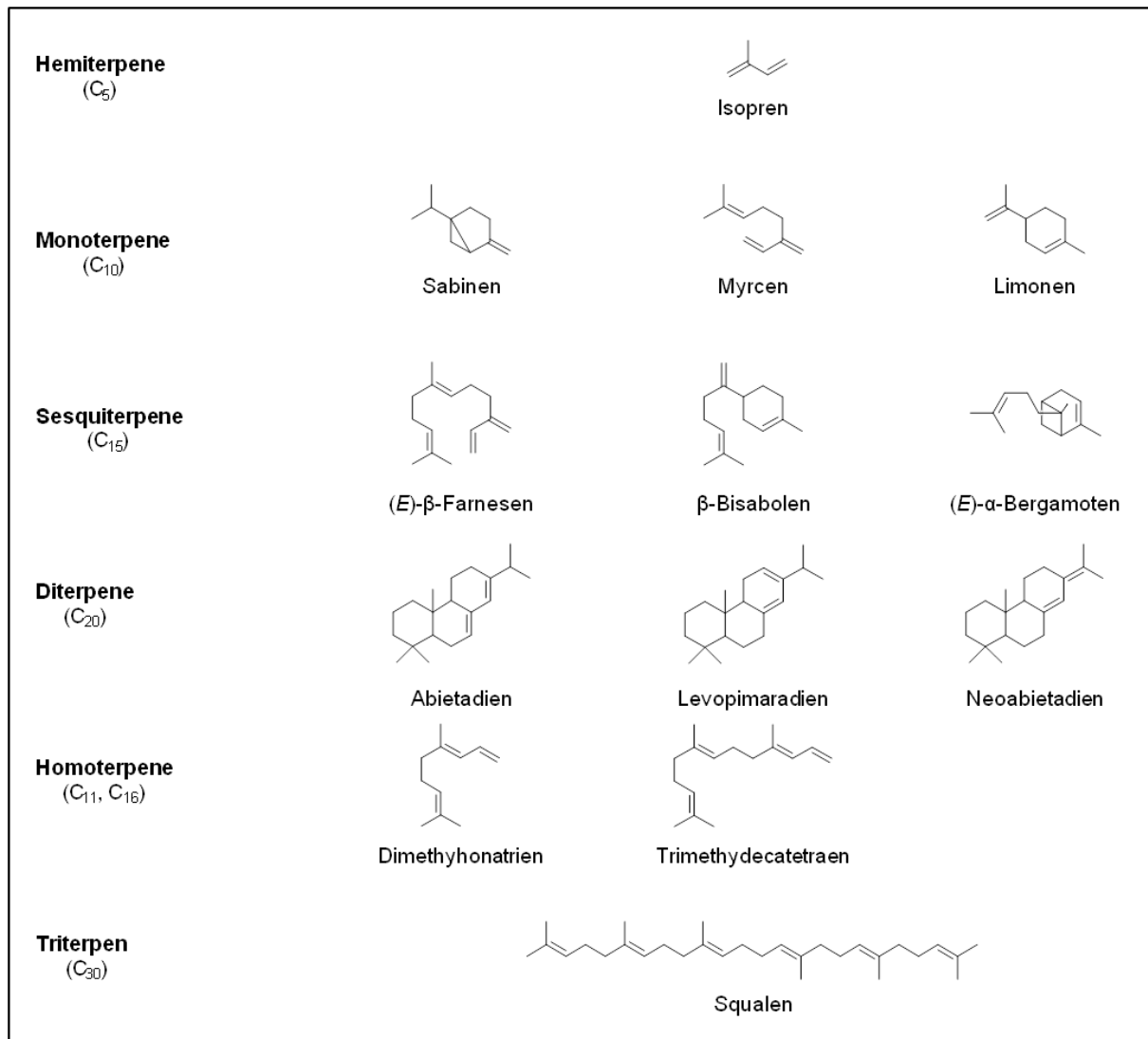


Abb. 2 Einteilung der Terpene anhand der Anzahl an Isoprenbausteinen

Eine Möglichkeit der Klassifizierung von Terpenen besteht durch die Anzahl an Isoprenuntereinheiten. Sie erfolgt in Hemi-, Mono-, Sesqui-, Di-, Tri- und Polyterpene. Neben den Terpenen lassen sich auch die Terpenoide auf diese Weise einteilen. Dazu gehören neben den Terpenen mit Heteroatomen und / oder funktionellen Gruppen, die Homoterpene, welche durch CYP-P450 Enzyme synthetisiert wurden.

Pharmazeutische Anwendungsgebiete und darüber hinaus

Darauf aufbauend konnten die Pflanzeninhaltsstoffe effizient analysiert werden, was zu gravierenden Veränderungen ganzer Industriezweige führte. So wurden Duftstoffe preiswerter, die Lackindustrie und die Kautschukverarbeitung entwickelten sich und viele

1 Einleitung

Arzneipflanzen konnten gezielt nach ihren wirksamen Inhaltsstoffen untersucht werden, woraufhin diese im industriellen Maßstab isoliert wurden. Die Isolierung der Terpene, die in Blättern, Blüten, Früchten und Wurzeln in Form von ätherischem Öl oder Harz gespeichert sind, erfolgt zum Beispiel mit den Methoden der Wasserdampfdestillation, der Kaltpressung oder einer Extraktion mit Hexan.

Der sich über die Jahrhunderte entwickelte Schatz an Arzneipflanzen konnte durch das Wissen über die Terpenoide/ Terpene untersucht werden und führte zur Identifizierung und späteren Klassifizierung der Inhaltsstoffe, was die nachfolgende Untersuchung der Wirkung einzelner Terpene erlaubte. Dadurch sind heute die Inhaltsstoffe vieler Arzneipflanzen analysiert und können ggf. gezielt isoliert werden, was die Wirksamkeit und Anwendungssicherheit der pflanzlichen Arzneimittel positiv beeinflusste. Häufig sind es Monoterpene (Abb. 3) wie 1,8-Cineol (*Eucalyptus globulus*) und Thymol (*Thymus vulgaris*), die durch ihren therapeutischen Nutzen Eingang in die Selbstmedikation fanden. So bewertete die Kommission E die expektorierende, bronchospasmolytische und antimikrobielle Wirkung von Thymol bei obstruktiven Atemwegsbeschwerden positiv. 1,8-Cineol als Hauptbestandteil in Eukalyptusöl ($\geq 70\%$) ist als Bestandteil von Hustensalben in Kombination mit Menthol, Campher und Terpentinen, allesamt Monoterpene, ebenfalls nicht mehr weg zu denken. Dies findet Ausdruck in der standardisierten Form einer Hustensalbe im „Neuen Rezeptur Formularium“ (Hustensalbe NRF 4.8) (Hänsel-Sticher 2007). Ein weiterer wichtiger Vertreter stellt der Salbei (*Salvia officinalis*) dar. Dieser enthält als Hauptbestandteil Thujon, Campher und 1,8-Cineol und wurde von der Kommission E als Mund- und Rachenraumtherapeutikum positiv bewertet.

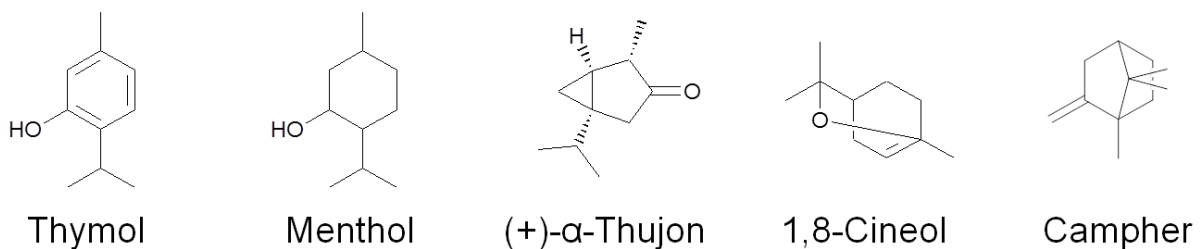


Abb. 3 Monoterpene mit therapeutischer Indikation

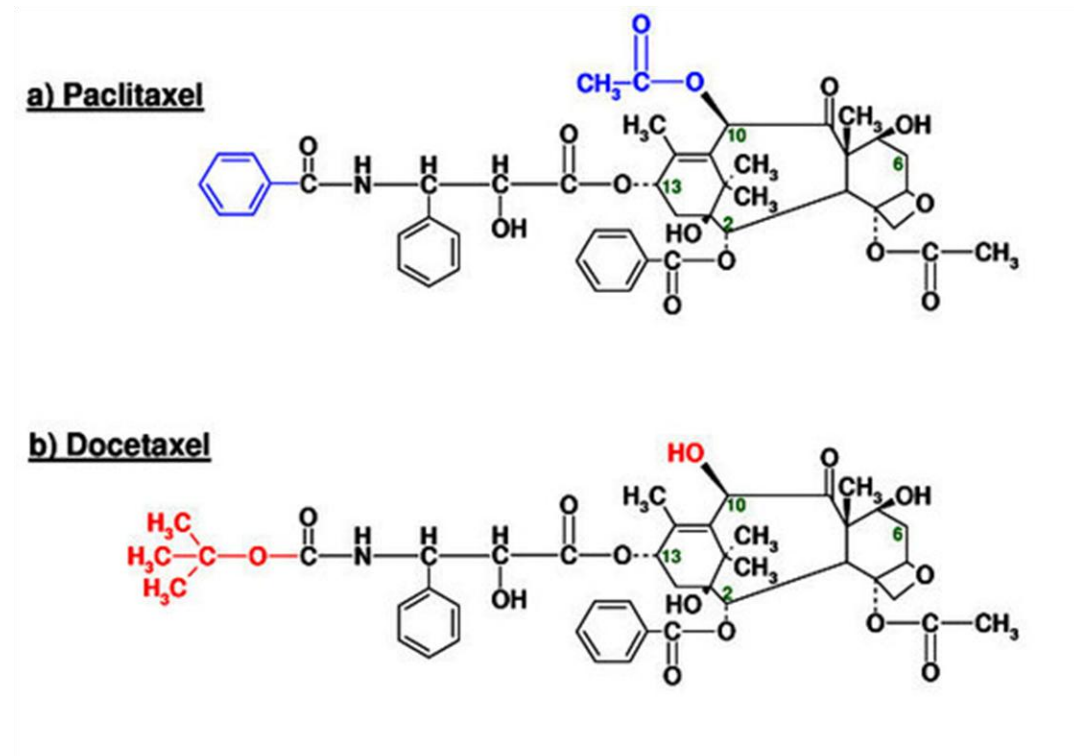
Die dargestellten Monoterpene zeigen die Vielfältigkeit von Strukturen von Terpenoiden, die pharmazeutisch als Therapeutikum bei Atemwegsbeschwerden und zur Durchblutungsförderung eingesetzt werden.

In der Volksmedizin spielte auch die Verwendung von sedativ wirkenden Pflanzen wie Hopfen (*Humulus lupulus*), Melisse (*Melissa officinalis*) und Baldrian (*Valeriana officinalis*) eine wichtige Rolle. Die sedative Wirkung bei Anwendung dieser Kombination wurde in einer klinischen Studie positiv bewertet (Orth-Wagner et al. 1995) ohne dabei die wirksamen Terpene zu benennen. In Hopfen (*Humulus lupulus*) wird das bei der Lagerung entstehende Hemiterpenalkohol 2-Methylbut-3-en-ol als ursächlich angesehen.

Die Nutzung von Naturstoffen in der Therapie von schweren Krankheiten erlangte 1971 große Bedeutung, als der „Krieg gegen Krebs“ durch den damaligen Präsidenten der Vereinigten Staaten R. M. Nixon ausgerufen wurde. In der Folgezeit wurden viele Naturstoffe untersucht und (Wani et al. 1971) gelang die Isolierung des Diterpenderivats Paclitaxel (Abb. 4) aus der Pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*). Die Wirkung als Mitosehemmstoff wurde erfolgreich zur Wachstumshemmung von Krebszellen ausgenutzt. Durch die Entdeckung des

1 Einleitung

strukturell einfacheren Taxan, Docetaxel (Bild2) aus der Europäischen Eibe (*Taxus baccata*), welches ebenfalls das Wachstum von Krebszellen wirksam hemmte, wurde darüber hinaus im Jahre 1994 ein synthetischer Zugang (Ojima et al. 1994) zum heute in der Therapie von Mamma-, Ovarial- und Bronchialkarzinomen eingesetzten Taxol® geschaffen. Die Zulassung in der BRD erhielt das Medikament 1995 und stellt seitdem eine wirksame Therapieoption dar. Die Herstellung des Naturstoffs erfolgt jedoch nicht klassisch durch Totalsynthese sondern biotechnologisch über Zellkulturen. Damit zeigt das Beispiel Taxol® die Entwicklung eines Arzneistoffs von der Isolation aus Pflanzen zur biotechnologischen Herstellung in Zellkulturen.



Quelle: www.springerimages.com

Abb. 4 Pflanzliche Zytostatika

Die Taxane Paclitaxel (*Taxus brevifolia*) und Docetaxel (*Taxus baccata*) waren der Anfang der Entwicklung von synthetischen Mitosehemmstoffen und damit der Anfang der modernen Krebstherapie. Paclitaxel unterscheidet sich strukturell von Docetaxel an Position C₁₀ durch die Veresterung mit Essigsäure, anstelle einer freien Hydroxylgruppe. Außerdem enthält Paclitaxel eine Benzylgruppe anstelle eines Isopropylrestes.

Allerdings führten bisherige Arbeiten nicht immer zum Ziel einer genauen Wirkungsbestimmung einzelner Terpene. Das beste Beispiel ist der Extrakt aus der Baldrianwurzel. Dieser besteht aus über 150 Einzelsubstanzen, wobei die meisten Inhaltsstoffe zu den Mono- und Sesquiterpenen gehören (Bos et al. 1997). Trotz zahlreicher Arbeiten ist es bisher nicht gelungen einen einzelnen Inhaltsstoff als ursächlich für die sedative Wirkung zu determinieren. Bis zur endgültigen Lösung gilt also das Grundprinzip der Phytotherapie „Der Extrakt ist der Wirkstoff“ (Hänsel-Sticher 2007).

1 Einleitung

Anwendung als Toxin Fraßhemmung

"In ein Fass voll Tabakslauge tunkt man ihn mit Haut und Haar ..."

Wilhelm Busch "Pater Filucius" 1872

Die toxische Wirkung von Pflanzeninhaltsstoffen sind seit langem bekannt und wurden, wie das Nikotin-Alkaloid im Zitat, literarisch erwähnt. Dies gilt auch für Terpene. Neben der pharmazeutischen Nutzung spielen die in Pflanzen gespeicherten, über einen sekundären Stoffwechselweg gebildeten, Terpene, eine wichtige Rolle als „Biowaffen“ für ihre ortsgebundenen Produzenten, zur direkten oder indirekten Verteidigung gegen Schädlinge. Harze (Terpentinharze) bilden mechanische Barrieren und wirken in hohen Konzentrationen des ätherischen Öls als Toxin oder Fraßhemmstoff.

Beispiele für die Toxizität, also der direkten Abwehrreaktion, einiger Terpene sind das Sesquiterpen-Dimer Gossypol und seine Derivate aus Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) (Liu et al. 1999; Stipanovic et al. 1999) und Pyrethrine, die bei Insekten als Nervengift wirken. Diese Terpenoide kommen in Chrysanthemenarten (*Tanacetum cinerifolium*) vor, die in der Heimat des Terpen-Forschers L. Ružička in Dalmatien vorkommen. Dort hatte das Chrysanthemenpulver auch den Beinamen „Persisches Insektenpulver“ und zeigt, wie lang die Wirkung dieser Pflanze bereits bekannt war.

Bei der indirekten Abwehr dienen nach Herbivorie gebildete Terpene als Lockstoff für parasitäre Insekten was die Population von Fraßschädlingen dezimieren kann und damit zur Verteidigung der Pflanze beiträgt (Turlings et al. 1990). Zu diesem Anwendungsgebiet zählen die Terpene der in dieser Arbeit behandelten Terpensynthase 10 (TPS10), welche nach Herbivorie in Blättern der Maispflanze induziert wird und mit einem spezifischen Verhältnis der gebildeten Terpene (E)- β -Farnesen und (E)- α -Bergabmoten Fraßfeinde anlockt (Schnee et al. 2002).

Das ubiquitäre Vorkommen von Terpenen spiegelt sich außerdem bei Pigmentstoffen (Carotinoide) wider. Diese sind Teil des Primärstoffwechsels und erfüllen bei der Photosynthese die Aufgabe des Elektronentransports (Ubichinone/ Plastochinone). In Kooperation mit anderen Zellverbänden sind Terpene Teil der Zellmembran (Phytosterole) oder steuern in der Form von Phytohormonen (Gibberellane) das Pflanzenwachstum.

1 Einleitung

1.2. Übersicht der Biosynthesewege heterogenen Ursprungs

1.2.1 Allgemein Terpenbiosynthese

Die Biosynthese von Terpenen ist im Grunde eine enzymatische Reaktion die die Bildung von aktiviertem Substrat auf Basis von Isoprengrundbausteinen voraussetzt. Die zwei bekannten Wege zur Synthese dieses Substrats sind der Acetat-Mevalonat-Weg und der Methylerythritolphosphat-Weg (MEP-Weg), welche jeweils in der Bildung von Isopentenyl-5-pyrophosphat (IPP) und seinem Isomer dem Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) resultieren.

Die wesentlichen Unterschiede der beiden Wege sind der Ort der Isoprenoidsynthese und die verwendeten Substrate. So findet der Mevalonatweg (Chaykin, Law et al. 1958; Lynen, Eggerer et al. 1958) vorrangig im Zytosol statt und nutzt aktivierte Essigsäurereste als Ausgangsstoff um zunächst Acetoacetyl-CoA zu bilden. Durch die Anlagerung eines weiteren Acetyl-CoA entsteht unter Einfluss der HMG-CoA-Synthase das 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA. Anschließend erfolgt eine Reduktion durch das am endoplasmatischen Retikulum fixierten Membranprotein HMG-CoA-Reduktase zu Mevalonat. Das Mevalonat wird unter Einfluss der Mevalonat-Kinase und Phosphomevalonat-Kinase in zwei aufeinander folgenden Schritten phosphoryliert. Zum Schluss erfolgt die Umsetzung zu IPP durch Decarboxylierung unter Einfluss der Diphosphomevalonat-Decarboxylase.

Der historisch jüngere MEP-Weg, der auch DOX-Weg oder GAP-Pyruvat-Weg genannt wird (Lichtenthaler et al. 1997), wurde unter anderem aufgrund der Einführung der Statine in den Arzneischatz entdeckt. Diese Stoffklasse, zu denen bekannte Wirkstoffe wie Simvastatin und Atorvastatin gehören, hemmen die HMG-CoA-Reduktase und unterbinden dadurch den Mevalonatweg. Die Terpenbildung war trotzdem möglich und somit ist dies ein weiteres Beispiel für den Fortschritt durch das Zusammenspiel von Anwendungs- und Grundlagenforschung. Der MEP-Weg findet bei Pflanzen in den Plastiden statt. Aber auch Einzeller wie *Plasmodium falciparum* (Malaria) sind zu diesem alternativen Weg zur Isoprenoidsynthese imstande. Als Ausgangsstoffe dienen beim MEP-Weg Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat. Unter Einfluss einer Desoxyxylosephosphat-Synthase (DXS) wird Kohlenstoffdioxid abgespalten und ein C5-Gerüst, die 1-Desoxy-D-Xylose-5-phosphat (DXP), entsteht. Daher wird dieser Stoffwechselweg auch DOXP-Weg genannt. Nach der anschließenden Reduktion entsteht 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP), welches über mehrere Schritte zur Synthese von IPP und DMAPP führt. Letztere können durch Isomerasen ineinander überführt werden.

Diese Untereinheiten (IPP, DMAPP) werden nun über verschiedene Prenyltransferasen/ Diphosphatsynthasen (GPP-Synthase, FPP-Synthase etc.) zu den aktivierten Substraten der Terpensynthasen zusammengeführt, womit auch die Größe des Kohlenstoffgerüsts festgelegt wird. Zum Beispiel entstehen mit Hilfe der Farnesylpyrophosphatsynthase (FPP-Synthase) aus zwei Molekülen IPP und einem Molekül DMAPP Farnesylpyrophosphat (FPP). Dieses dient nachfolgend Sesquiterpensynthasen als Substrat für die Biosynthese von Sesquiterpenen (Abb. 5).

1 Einleitung

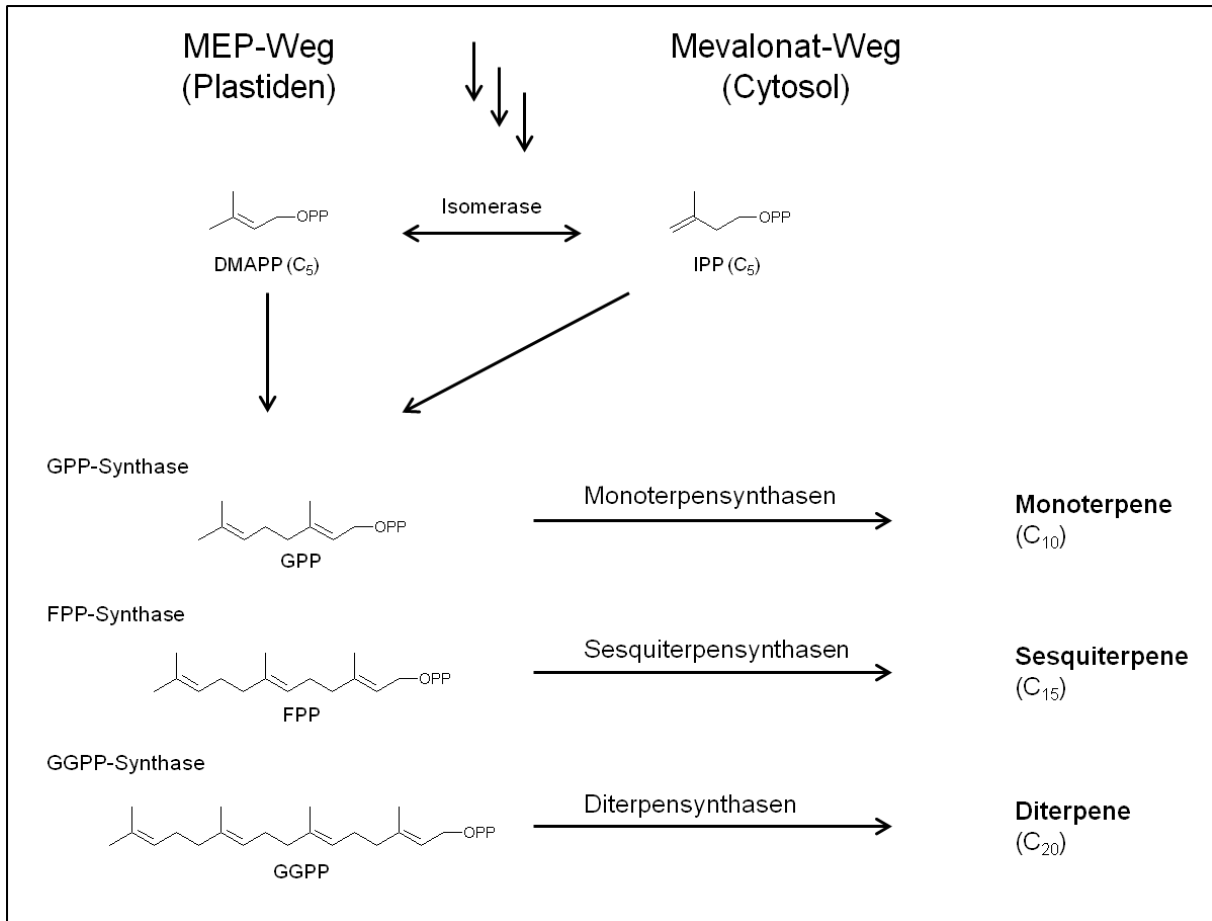


Abb. 5 Grundlagen zur Bildung von Terpenen durch das Zusammenspiel verschiedener Enzymklassen
Die Abbildung zeigt die Terpenbildung aus zwei unterschiedlichen Startreaktionen über das zentrale IPP. Diverse Prenyltransferasen formen aus dem IPP die aktivierten Substrate (GPP, FPP, GGPP), welche durch differente Terpensynthasen zur Bildung von entsprechenden Terpenen führen.

1.2.2 Struktur und Reaktionsmechanismen von Terpensynthasen

Der molekulare Aufbau von Terpensynthasen entspricht prinzipiell dem Beispiel der kristallisierten Abietadiensynthase (Zhou et al. 2012) in Abb. 6. Diese Diterpensynthase besteht aus 3 Domänen (α , β , γ), wobei die Synthese N-terminal mit der β -Untereinheit beginnt und der α -Untereinheit C-terminal endet. Die γ -Untereinheit liegt innerhalb der Aminosäuresequenz der β -Untereinheit und ist also eingeschoben. Bei Mono und Sesquiterpensynthasen ist eine solche γ -Untereinheit bisher nicht bekannt. Der grundsätzliche Aufbau ist α -helical und eine große, hier in grün dargestellte α -Helix, ist charakteristisch für die Verbindung zwischen α - und β -Untereinheit. Das aktive Zentrum der ionisations-abhängigen Reaktion s. u. liegt zudem meist im Bereich der α -Untereinheit. Der grundsätzlich gleiche Aufbau spricht für eine gemeinsame Herkunft, wobei aktive Enzyme bekannt sind, wie die Pentalensynthase aus *Streptomyces* UC5319 (Cane et al. 1994; Lesburg et al. 1995), die strukturell im Enzymaufbau abweichen. Interessanterweise trifft dies auch auf die Prenyltransferasen zu, die sich in Aufbau und Funktion den Terpensynthasen der Klasse 1 (s. u.) ähneln (Reardon and Farber 1995).

Die Bildung von Terpenen in Terpensynthasen kann auf bisher zwei bekannten Wegen initiiert werden. Klasse 1-Terpensynthasen sind nach dem Eindringen des Substrats ins

1 Einleitung

aktive Zentrum auf einen energieminimierenden Komplex aus zweiwertigen Metallionen und Aminosäuren (Arginin) angewiesen um das Diphosphat vom Substrat abzuspalten. Das entstehende Carbokation durchläuft eine Reaktionskaskade an deren Ende die Bildung der Terpene durch Deprotonierung steht. Der grundlegende Vorgang entspricht demnach einer Ionisierungsreaktion und man findet ihn bei allen Mono- und Sesquiterpensynthesen, sowie einige Di- und Sesterterpensynthesen (Christianson 2006). Für die Bindung der Metallionen sind ein bis zwei Metallionenbindemotive notwendig, welche auf jeweils einer α -Helix am Eingangsbereich zum aktiven Zentrum lokalisiert sind. Das bei den bisher veröffentlichten Sesquiterpensynthesen am häufigsten vorkommende Motiv ist das DDXD-Motiv auf α -Helix D (Starks et al. 1997). Additiv liegt auf der gegenüberliegenden α -Helix H häufig ein NSE-Motiv oder DTE-Motiv. Für andere Klasse 1 Terpensynthasen wie Monoterpensynthasen gilt dies analog. Diese Form der Startreaktion findet bei den entsprechenden Terpensynthasen im Bereich der oben beschriebenen Metallbindemotive und dem resultierenden zweiwertigen Metallionenkomplex am Eingang zum aktiven Zentrum statt, welches auf der c-terminalen Domäne lokalisiert ist und in Abb. 6 der α -Untereinheit entspricht. Das Innere des Zentrums besteht aus lipophilen Aminosäuren und gilt nach Bindung des Substrats als nach außen abgeschlossen. Daraus resultiert ein lipophiles Milieu welches auch als „inertes lipophiles Solvent“ bezeichnet wird. Dort finden im Anschluss der Ionisierung zahlreiche Zyklisierungen und Umlagerungen statt, die enzymabhängig zu einem oder mehreren Terpenen führen.

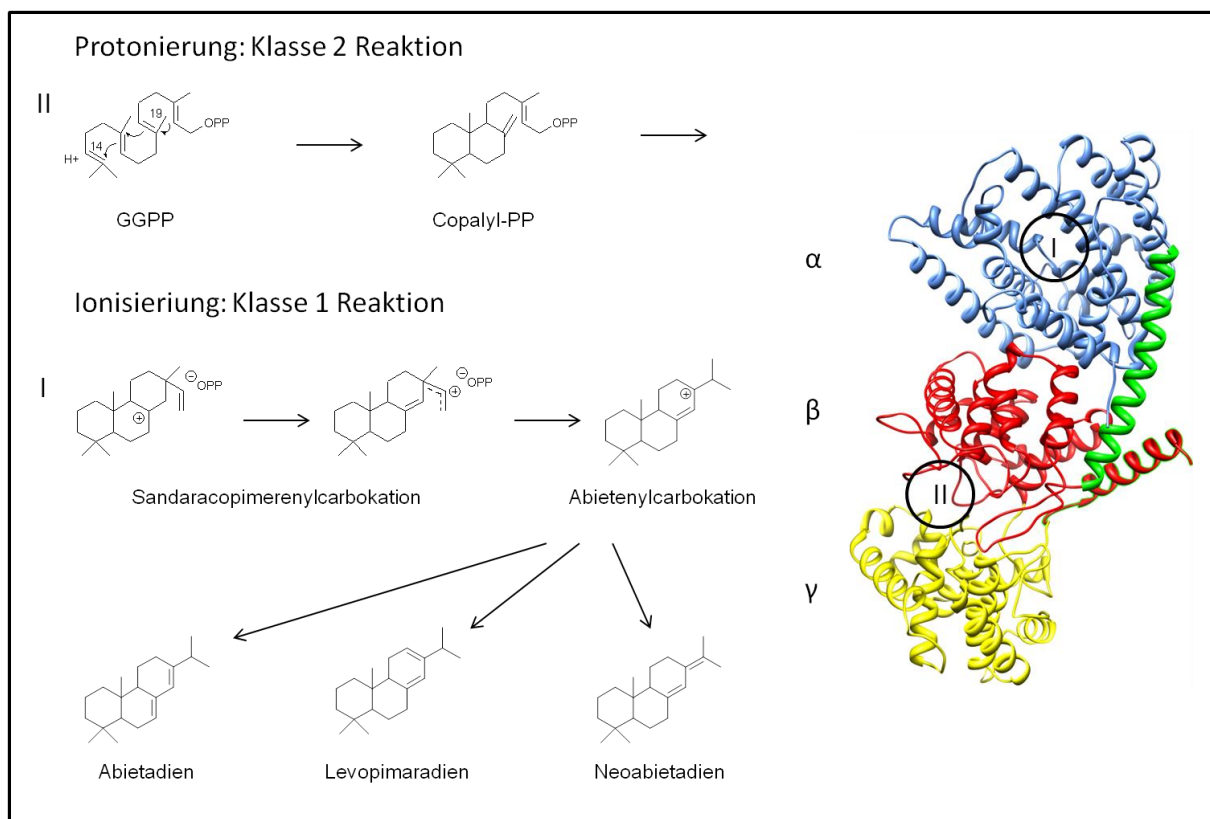


Abb. 6 Reaktionsklassen zur Bildung von Terpenen

Die Abietadiensynthase, eine bifunktionale Diterpensynthase (*Abies grandis*) (Peters and Croteau 2002), zeigt die Klasse I und II Reaktion innerhalb eines Proteins. Die Reaktionsklassen unterscheiden aufgrund ihrer Startreaktion. Die Klasse I Reaktion ist festgelegt als Ionisierung, Klasse II Reaktionen als Protonierung. Die Darstellung des Proteins zeigt die α (blau), β (rot) und die integrierte γ -Untereinheit (gelb). Die römischen Ziffern innerhalb des Proteins, zeigen die Lage des aktiven Zentrums der jeweiligen Reaktionsklasse. Strukturhomologien anderer Proteine führen nicht zwingend zum Vorkommen eines aktiven Zentrums der entsprechenden Reaktionsklasse.

1 Einleitung

Klasse 2-Reaktionen beginnen mit der Protonierung des aktiven Substrats im Bereich von Kohlenstoffdoppelbindungen oder Epoxidringen, was eine Umlagerung zur Bildung eines stabileren Substrats (Abb. 6) zur Folge hat. Dieser Reaktionsweg setzt einen sogenannten α -Barrel-fold des Enzyms, wie er bei Di- und Triterpensynthesen vorkommt, voraus. Diese spezielle Faltung lokalisiert das aktive Zentrum und enthält, analog zum DDXXD-Motiv der Klasse 1 Reaktion, ein hoch konserviertes DXDD-Motiv, welches als Protonendonator fungiert (Peters et al. 2001). Bei Triterpensynthesen wie z. B. der Squalen- und Oxidosqualensynthese (Wendt et al. 1997; Wendt et al. 1999) liegen ausschließlich Klasse 2 Reaktionen vor. Diterpensynthesen können beide Reaktionsklassen aufweisen. So laufen bei der bifunktionalen Abietadiensynthese (*Abies grandis*) beide Reaktionswege, Protonierung und Ionisierung, kombiniert ab (Peters, Ravn et al. 2001). Das Enzym verfügt über zwei aktive Zentren, welche je einen Reaktionstyp katalysieren und auf diese Weise voneinander abhängig sind. Die Lokalisation und der Aufbau der aktiven Zentren im Protein sind analog zu bisher beobachteten Terpensynthesen, was für die Verwandtschaft der Terpensynthesen spricht. Eine weitere bekannte bifunktionale Terpensynthese ist die ent-Kaurensynthese aus Fungus *Phaeosphaeria* sp. L487 (Kawaide et al. 1997). In höheren Pflanzen zeigte sich, dass die Funktion auf zwei Enzyme, der Copalylsynthase (Klasse II) und der Kaurensynthese (Klasse I), verteilt waren, aber das gleiche Molekül gebildet wurde. Dies stellt ebenfalls ein Indiz für die Hypothese der Verwandtschaft von Terpensynthesen dar.

1.2.3 Terpensynthesen sind oft Multiproduktenzyme

Die in Kapitel 1.1.2 erklärten Mechanismen führen bei den meisten Terpensynthesen mit einer hohen Genauigkeit zu einem spezifischen Produkt. Ein gutes Beispiel ist die Lanosterolsynthese die es bei der Zyklisierung von (S)-2,3-Oxidosqualen fertig bringt aus 128 möglichen Stereoisomeren gezielt das Lanosterol zu bilden (Christianson 2006). Andere Terpensynthesen wie TPS10 aus der Maisinzuchtlinie B73 sind dagegen Multiproduktenzyme, d. h. sie bilden mehrere Endprodukte. Die Tatsache, dass häufig niedrigere Pflanzen Terpensynthesen aufweisen welche eher ungenau arbeiten, wird von einigen Leuten als unvollständig evolutionierte Terpensynthesen abgetan. Meiner Meinung nach stellt die Multiproduktbildung allerdings eine eigene Abwehrstrategie der Pflanzen dar, da versucht wird sich durch Diversität Optionen zur Verteidigung offen zu halten (Degenhardt et al. 2003).

Bei der Maispflanze wird die Bildung der Sesquiterpensynthase TPS10 nach dem Befall mit Herbivoren (*Spodoptera littoralis*) in den Blättern induziert. Es konnte dabei gezeigt werden, dass die resultierende Bildung von volatilen Sesquiterpenen, v. a. (*E*)- β -Farnesen und (*E*)- α -Bergamoten, parasitäre Insekten (*Cotesia marginiventris*) anlocken und über dieses tritrophische System die Schädlingslast gesenkt wird (D'Alessandro and Turlings 2005; Hoballah and Turlings 2005; Schnee et al. 2006). Die Schlupfwespen lassen sich demnach von einer definierten Zusammensetzung leiten. Die Funktion des gebildeten Terpengemischs ist also klar die Fraßabwehr. Das Spektrum der gebildeten Sesquiterpene umfasst neben dem azyklischen (*E*)- β -Farnesen und (*E*)- α -Bergamoten als Hauptprodukte, fünf weitere zyklische Sesquiterpene (Abb. 7). Daher ist davon auszugehen, dass die Funktion der Multiproduktenzyme eine weitere Strategie zur Schädlingsabwehr darstellt, da aufgrund der größeren Vielseitigkeit in Art und Menge an gebildeten Terpenkohlenwasserstoffen die potentielle Attraktivität für unterschiedliche Fraßfeinde gesteigert ist. Weitere Beispiele für

1 Einleitung

Multiproduktenzyme sind die Maisterpensynthese TPS4 (Köllner et al. 2006) (Abb.8), welche bis zu 14 verschiedene Produkte bildet und die δ -Selinensynthese Sesquiterpensynthese aus *Abies grandis* mit 52 gebildeten Produkten (Steele et al. 1998).

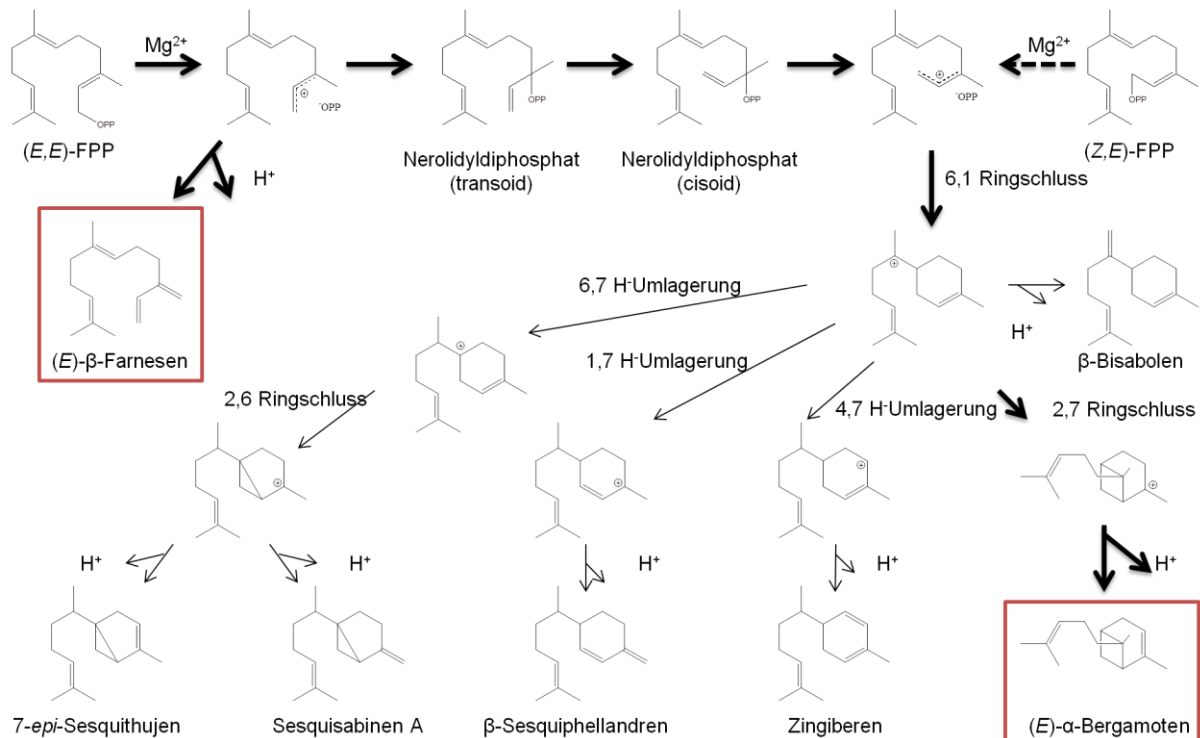


Abb. 7 Postulierte Terpenbiosynthese von TPS10 aus *Zea mays*

TPS10 bildet aus dem Substrat (E,E) -FPP über mehrere Zwischenprodukte Sesquiterpene. Die beiden Hauptprodukte sind das azyklische (E) - β -Farnesen und das bicyklische (E) - α -Bergamoten. Zur Bildung von zyklischen Terpenen durchläuft die Kaskade eine Isomerisierung über das Nerolidyldiphosphat, danach die Zyklisierung zum zentralen Bisabolylcarbocation und abschließend Wagner-Meerweinumlagerungen an verschiedenen Position mit anschließender Deprotonierung. Durch die Zugabe von (Z,E) -FPP besteht die Möglichkeit die Isomerisierung nahezu auszuschließen und damit die Bildung von zyklischen Terpenen zu forcieren. Das prozentuale Verhältnis der zyklischen Terpene bleibt dabei erhalten. (Köllner et al. 2009)

Aus diesen interessanten Fakten ergeben sich zahlreiche Fragestellungen zum carbokationischen Reaktionsmechanismus als Ursache für diese Vielfalt. Am Beispiel der Sesquiterpensynthese TPS10 (Abb. 7) lassen sich fünf Reaktionsphasen ableiten, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurden. Zu diesen fünf Phasen zählen die Initiation (Klasse 1 o. 2-Reaktion), Isomerisierung, Zyklisierung, Hydridumlagerung und abschließende Deprotonierung. Ein Ziel dieser Arbeit stellte die Untersuchung von TPS10 nach Aminosäuren im aktiven Zentrum welche eine zielgerichtete Steuerung der einzelnen Reaktionsabschnitte ermöglichte. Das Hauptaugenmerk lag insbesondere bei der Isomerisierung. Dieser Vorgang fasst den postulierten Vorgang der Rephosphatierung an C3 des Carbokations (Starks, Back et al. 1997), einer anschließenden Drehung um die Achse C2-C3 und erneuter Dephosphatierung, zusammen. Am Beispiel von TPS10 entspricht dies der Bildung von transoiden Nerolidyldiphosphat, der Drehung zur cisoiden Form und der Dephosphatierung zum cisoiden Farnesylcarbocation. Die Rephosphatierung ist dabei in der Theorie notwendig, um die aufgrund der delokalisierten Ladung vorliegenden starren

1 Einleitung

Konformation zu durchbrechen. Dazu wurden neben den trans-Edukt (*E,E*)- β -FPP auch cis-Edukte wie (*Z,Z*)- β -FPP (Sallaud et al. 2009) und (*Z,E*)- β -FPP verwendet, um den Einfluss der Isomerisierung auf die Gesamtreaktion zu betrachten.

Weiterhin können die verschiedenen Reaktionsmöglichkeiten, die durch die Lage funktioneller Gruppen bestimmt sind, durch ein flexibles Substrat genutzt werden, um mehrere Produkte zu bilden. Daher hängt es vom Aufbau des Proteins ab, welche Terpene gebildet werden können. Im speziellen sind es das Volumen des aktiven Zentrums, die Position und das Vorkommen von stabilisierenden Aminosäureresten, Protonendonatoren und -akzeptoren innerhalb der Bindungstasche, die unabhängig vom Milieu die Reaktionskaskade beeinflussen. Die Stabilisierung der Ladung eines carbokationischen Intermediats an einem bestimmten Punkt im Molekül wird zuletzt auch die gebildete Menge dieses Terpens positiv beeinflussen. Diese Punkte zu finden, die Einflüsse auf den Terpenbildungsprozess zu verstehen und durch Veränderung das Produktionsverhalten des Enzyms zu lenken, ist ein weiteres Ziel dieser vorliegenden Arbeit. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche dienen demnach dem Verständnis von Struktur-Funktionsbeziehungen in Enzymen und dem Fernziel eines rationalen Designs von spezifischen Enzymen zur Produktion komplexer pharmazeutisch interessanter Wirkstoffe.

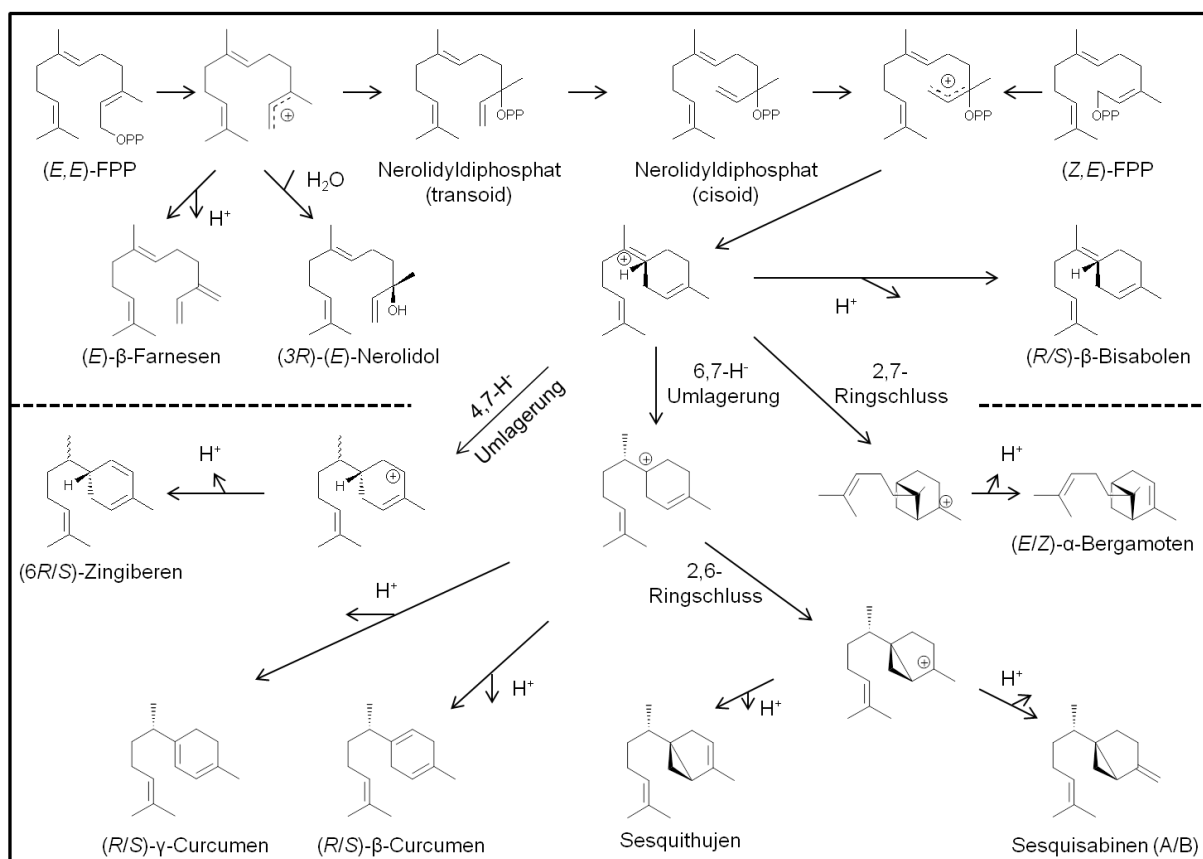


Abb. 8 Postulierte Reaktionskaskade in TPS4 aus *Zea mays*

Der postulierte Reaktionsmechanismus für TPS4 basiert auf Untersuchungen zu TPS4 und 5 (Köllner et al. 2004). Die Reaktion verläuft in 5 Reaktionsphasen und bildet verschiedene azyklische, monozyklische und bicyklische Terpene. Die Reaktion verläuft vergleichbar der TPS10-Kaskade ab (Abb.7). Die Reaktionsabschnitte erfolgen im Unterschied zu TPS10 in zwei verschiedenen Bindungstaschen. Oberhalb der gestrichelten Linie sind die Reaktionen in Tasche I dargestellt und unterhalb die in Tasche II. Die vereinfachte Darstellung zeigt nicht alle Stereoisomeren im Detail.

1 Einleitung

1.3 Ziel dieser Arbeit

Die Prozesse zur Bildung von komplexen Terpengemischen sind bereits gut untersucht. Sie zeigen wie Pflanzen in der Lage sind sich den biotischen und abiotischen Umwelteinflüssen durch Veränderungen ihrer Sekundärstoffwechsel anzupassen. Die Maispflanze ist dabei eines der gut untersuchten Pflanzenmodelle. So wurden z. B. Arbeiten zum tritrophischen System um die Maispflanze durchgeführt welche zu interessanten Ergebnissen führten. Röntgenkristallstrukturanalysen zeigten bei den Terpensynthasen ein immer wiederkehrendes Faltungsmuster und einen ähnlichen Aufbau der lipophilen aktiven Zentren mit ihren Eingangsbereichen, die die Fähigkeit besitzen Metallionen zu chelatisieren. Es wurden zwei Reaktionswege etabliert um Sesquiterpene zu erhalten. Die Reaktionsarten, die zu verschiedenen Sesquiterpenen führen, wurden bestimmt und bis ins Detail mechanistisch geklärt. Was gibt es also noch zu forschen?

Es bleiben trotz aller bisherigen Bemühungen zahlreiche Fragen ungeklärt. So konnte bisher nicht geklärt werden welchen Einfluss der strukturelle Aufbau des aktiven Zentrums auf die Funktionsweise hat. Als Beispiel lassen sich hier das N- und C-terminale Ende am Beispiel von TPS10 in Mais nennen. Halten diese Strukturen eventuell Wasser vom inneren des aktiven Zentrums fern, oder sind strukturelle Umlagerungen dafür verantwortlich? Daher standen die Einflüsse der Enzymstruktur auf den Reaktionsmechanismus von TPS10 im Fokus dieser Arbeit. Dabei sollte besonders zur Isomerisierung des Substrats, welches für die Bildung zyklischer Terpene verantwortlich zeichnet untersucht werden. Zur Abrundung der mechanistischen Untersuchung wurde das Innere des aktiven Zentrums auf funktionsobligate Elemente hin untersucht, um die katalytischen Prozesse besser verstehen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Mikrobiologische Methoden

2.1.1 Bakterienstämme

Die im Verlauf dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Gerichtete Mutagenesen, Klonierungsarbeiten, Stammhaltung und Proteinüberexpression in Vektoren mit einem tet-Promoter wurden im Top10 Stamm von *Escherichia coli* (*E. coli*) durchgeführt.

E. coli BL21(D3) wurde ausschließlich zu Klonierungsarbeiten und Überexpressionen an T7-Promotor haltigen Vektoren verwendet.

Tabelle 1 Beschreibung der verwendeten Bakterienstämme

Bezeichnung/ Herkunft	Genotyp
<i>E. coli</i> TOP10 (Invitrogene, Carlsbad, USA)	F-mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 ga/U ga/K rpsL (Str ^R) endA1 nupG
<i>E. coli</i> BL21(D3) (Novagen, Madison, USA)	F ⁻ ompT gal [dcm] [lon] hsdSB (rB ⁻ mB ⁻ , <i>E. coli</i> B strain) DE3 (λ Prophage mit T7- RNA-Polymerasegen)

2.1.2 Antibiotika

Tabelle 2 Antibiotikakonzentrationen

	Stammlösung (mg/ ml in <i>aqua dest.</i>)	Endkonzentration (μg/ ml Medium)
Ampicillin	100	100
Chloramphenicol	20	20
Kanamycin	50	50

2.1.3 Medien

LB-Medium 25 g LB- Medium (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) / 1 l *aqua dest.*

LB-Agar 32 g LB-Agar (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) / 1 l *aqua dest.*

TB-Medium 12 g Trypton (Sigma-Aldrich), 24 g Hefeextrakt (Sigma-Aldrich)
4 ml Glycerin, 2.31 g KH₂PO₄, 12,5 g K₂HPO₄ / 1 l *aqua dest.*

SOC-Medium 2 % (g/V) Trypton (Sigma-Aldrich), 0,5 % (g/V) Hefeextrakt
(Sigma-Aldrich), 0,5 % (g/V) Glucose, 10 mM NaCl,
2,55 mM KCl, 21,6 mM MgCl₂, 20 mM MgSO₄

2 Material und Methoden

2.1.4 Stammhaltung und Kultivierung von Bakterien

Die Stammhaltung erfolgte in *E.coli* TOP10. Dazu wurde 1 ml Submerskultur mit 300 µl Glycerol versetzt und bei -80 °C gelagert.

Die Erzeugung der Submerskulturen von *E.coli* erfolgte standardisiert innerhalb von ca. 16 h bei 37 °C im Schüttelinkubator mit 220 U/min in LB-Medium.

Emerskulturen wurden auf LB-Agar über Nacht im Brutschrank bei 37 °C kultiviert.

2.1.5. Transformation von *E.coli*

2.1.5.1 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli* Zellen nach der CaCl_2 -Methode

Ein 250 ml Erlmeyerkolben mit 25 ml LB-Medium wurde mit den gewünschten *E.coli* Zellen geimpft und bei 37 °C, 6 h auf einem Flachsüttler inkubiert. Danach wurde ein 1 l Erlmeyerkolben, mit 250 ml LB-Medium befüllt und mit 10 ml der Startkultur geimpft. Dieser wurde ca. 16 h, bei 18 °C, in einem Kühlschüttler, bis zu einer OD_{600} 0,5-0,6 inkubiert. Nach der Zentrifugation (2500 U/min, 10 min, 4 °C) wurde der Überstand vollständig verworfen und das Zellpellet in 80 ml INONE-Puffer (55 mM MnCl_2 , 15 mM CaCl_2 , 150 mM KCl, 2 % 0,5 M PIPES pH 6.7, steril filtriert) resuspendiert. Die Suspension wurde 1 h auf Eis gestellt und anschließend erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 20 ml INONE-Puffer aufgenommen. 1,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde hinzugegeben und die Suspension 10 min auf Eis gestellt. Danach wurde der Ansatz zu 100 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.1.5.2 Transformation durch Hitzeschock-Methode

50 µl einer Suspension chemisch kompetenter *E.coli* Zellen in Ca^{2+} /Tris wurden 30 min auf Eis aufgetaut. Danach wurde DNA hinzugefügt (50 - 500 ng) und erneut 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz bei 42 °C im Wasserbad für 40 s erwärmt und 100 µl SOC-Medium zugefügt, für 45 min bei 37 °C im Schüttelinkubator bei 220 U/min inkubiert und am Ende auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausgestrichen.

2.2. Nukleinsäureisolierung

2.2.1. Plasmidisolierung aus *E.coli*

Die Präparierung von Plasmid-DNA erfolgte nach Birnboim (Birnboim and Doly 1979). Es wurden *E.coli*-Zellen der Emerskultur in 4 ml LB-Medium über Nacht kultiviert. Die Aufarbeitung wurde analog der Gebrauchsanweisung des NucleoSpin®-Plasmid Kit (Macherey-Nagel, Düren) umgesetzt. Der Ansatz wurde nach Zentrifugation in 250 µl Resuspensionspuffer P1 resuspendiert. Die Lyse der Bakterienzellen erfolgte im basischen SDS-haltigen Lysepuffer P2 über eine Zeit von 5 min bei Raumtemperatur. Zur Neutralisation erfolgte die Zugabe von essigsäurehaltigem Neutralisationspuffer P3. Der Puffer enthielt zusätzlich Guanidinhydrochlorid, was zur Ausfällung von Proteinen der Bakterienzelle führte. Der Ansatz wurde jeweils nach Zugabe von Puffer P2 und P3 vorsichtig geschwenkt und für 5 min auf Eis inkubiert. Danach wurde bei 11000 g zentrifugiert. Die im klaren Lysat

2 Material und Methoden

enthaltene Plasmid-DNA wurde mittels Ethanolpräzipitation gefällt. Dazu wurde die Plasmid-DNA im Lysat durch Zentrifugation während des Durchgangs durch eine Fritte an diese gebunden. Mit 600 µl eines alkoholischen Puffers P4 gewaschen und nach Trocknung in der Zentrifuge (11000 g, 2 min) mit 30-50 ml Tris-Elutionspuffer P5 eluiert.

Im Anschluss wurde die Reinheit und Konzentration der Plasmidpräparation mit dem Tecan®Infinite200 auf NanoQuant™ Platten bestimmt.

2.3 DNA-Techniken

2.3.1 Oligonukleotide

In der Tabelle 2.3 (siehe Anhang) sind alle von mir erstellten und in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide aufgeführt. Sie sind nach der laufenden internen Nummer geordnet. Sequenz und Verwendungszweck sind angegeben. Die Orientierung ist für den 5´->3´ Strang mit „fwd“ (forward) und den 3´->5-Strang mit „rev“ (reverse) angegeben. Die Oligonukleotidsynthese erfolgte hauptsächlich durch die Firma MWG-Biotech (Ebersbach). Ein kleiner Teil wurde durch die Firma GATC (Konstanz) synthetisiert.

2.3.2 PCR als Methode zur Amplifikation von DNA-Fragmenten

Zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten aus Plasmid-DNA wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) eingesetzt. Dafür wurde die Go-Taq-Polymerase (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) bei analytischen Ansätzen wie der Untersuchung von Emerskulturen verwendet. Die Turbopfu®-DNA-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA) wurde zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA z.B. bei der gerichteten Mutagenese verwendet.

Ein standardisierter Ansatz einer PCR bestand aus 1 µl Polymerase, 5 µl Polymerasepuffer, 2 µl Oligonukleotid-A (10 pmol/µl), 2 µl Oligonukleotid-B (10 pmol/µl), 1 µl Template-DNA, 1 µl dNTP-Mix(10 mM). Als Lösungsmittel wurden 37 µl steriles *aqua dest.* verwendet. Der verwendete Thermocycler war Primus 96 Plus (MWG-Biotech, Ebersbach).

Die Standardprogrammierung war wie folgt:

94 °C	2 min	Denaturierung der DNA-Matrize
94 °C	30 s	Denaturierung der DNA-Matrize
55 bis 65 °C	20 s	Anlagerung der Oligonukleotide an die Matrize (Annealing)
72 °C	1 bis 2,5 min	Synthese des Komplementärstranges (Extension)
72 °C	5 min	Vervollständigung der DNA-Synthese

Eine Anpassung erfolgte aufgrund der Synthesegeschwindigkeit der eingesetzten Polymerase. Hierfür wurden 1000 Nukleotide/min angenommen.

Ebenfalls wurde die Anlagerungstemperatur der gegebenen Schmelztemperatur des Oligos folgendermaßen angepasst: $T_{\text{Anneal}} = T_{\text{Schmelz}} - (3 \text{ bis } 5) \text{ °C}$

2 Material und Methoden

2.3.3 Restriktion von DNA für spätere Klonierung

Es wurden verschiedene Restriktasen der Firmen Fermentas (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) und New England Biolabs (Schwalbach) verwendet. Analog kamen die entsprechenden, zehnfach konzentrierten Puffer zum Einsatz. Damit ergab sich in der Regel ein Reaktionsgemisch von Enzym (1-10 U), Puffer und DNA (1-10 mg in *aqua dest.* oder TE), welches bei der optimalen Reaktionstemperatur (meistens 37 °C) für 1 bis 2 h inkubiert wurde.

Zum Abbruch der Restriktion wurden die verwendeten Enzyme, wenn nicht anders erwähnt, bei 80 °C denaturiert.

2.3.4 Ligation von amplifizierter- und Plasmid-DNA

Nach der Erzeugung von kompatiblen DNA-Überhängen wurden Insert-DNA und Vektor-DNA im Verhältnis 5:1 mit 1 U T4-DNA-Ligase (Invitrogen, Carlsbad, USA) und ATP-enthaltenden 10x Ligasepuffer angesetzt und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.

2.3.5. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die Bande ligierter Plasmid-DNA wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und laut Vorschrift des Gel-Extraction-Kit (Macherey&Nagel, Düren) gereinigt. Zunächst wurde die Agarose durch Hitze (50 °C) verflüssigt und anschließend unter Hochsalzbedingungen an die Fritte (Säulenmatrix) gebunden. Nach der Reinigung mit einem ethanolhaltigen Puffer, wurde mit 30 bis 50 µl 5 mM Tris-HCL (pH 8.5) eluiert.

2.3.6. Klonierung von DNA-Fragmenten

Als Ausgangsmaterial der Klonierung diente die zuvor durch (Schnee, Köllner et al. 2006) isolierte und charakterisierte cDNA tps10 aus der Mais Inzuchtlinie B73. Diese wurde in den Vektor pASK-IBA7 zwischenkloniert. Daraus wurden DNA-Fragmente durch PCR (s. 2.3.2) unter Benutzung geeigneter Oligonukleotide amplifiziert. Die Oligonukleotide erfüllten zwei Funktionen. Zum einen besaßen sie eine Erkennungssequenz für Restriktasen, um sie im späteren Verlauf spezifisch verdauen zu können. Zum anderen banden sie an den gewünschten DNA-Abschnitten und fixierten auf diese Weise die für die Polymeraseaktivität wichtige Hydroxylfunktion am 3'-Ende. Im Anschluss an die PCR unterlag der verwendete Vektor und das gewünschte DNA-Fragment einem Verdau (siehe Punkt 2.3.3). Dies führt zur Linearisierung des Vektors und der Freilegung der kompatiblen Enden von Vektor und DNA-Fragment. Durch Ligation (siehe Punkt 2.3.4) erfolgte der Verbund von linearisierten Vektor (siehe Tabelle 2) und DNA-Fragment. Wenn nicht anders erwähnt, wurde die Klonierung nach (Zeng 1998) durchgeführt. Das bedeutet die verwendeten Restriktasen schnitten die DNA versetzt, um klebrige Enden (sticky end) zu erhalten. Dies ermöglichte eine gerichtete 5' - 3'-Klonierung.

2 Material und Methoden

Tabelle 3 Beschreibung verwendeter Vektoren

Vektor	Beschreibung	Verwendung
pASK-IBA33+ [IBA GmbH, Göttingen]	bakterieller Expressionsvektor, C-terminalen 6xHisTag, 3250bp, Ap ^r , tet-Promotor, origin of replication f1	Überexpression His-Markierter Proteine in <i>E.coli</i>
pASK-IBA37+ [IBA GmbH, Göttingen]	bakterieller Expressionsvektor, N-terminaler 6xHisTag, 3270bp, Ap ^r , tet-Promotor, origin of replication f1	Überexpression His-Markierter Proteine in <i>E.coli</i>
pBAD33	bakterieller Expressionsvektor, keine Tags, 5352bp, Ap ^r , Cm ^r , ara-Promotor, origin of replication	Überexpression Proteine in <i>E.coli</i>
pACYC-DUET-1 [Novagene]	bakterieller Expressionsvektor, 2 MCS, N-terminalen His-Tag MCS1, C-terminalen Strep-Tag MCS2, 4008bp, Cmr, T-7 Promotor, p15A origin of replication	Überexpression His-u.-Strep-Markierter Proteine in <i>E.coli</i>
pCR®4-TOPO® [Invitrogene, Carlsbad, USA]	bakterieller Klonierungsvektor 3956bp, Ap ^r , Km ^r	Klonierung von PCR-Fragmenten mit 3`-A-Überhang

2.3.7 Gerichtete Mutagenese

Die gerichtete Mutagenese kam im Verlauf dieser Arbeit zur Aufklärung von Struktur-Funktions-Beziehungen im „Aktiven Zentrum“ und der Peripherie von TPS10 zum Einsatz und diente damit der Aufklärung des Reaktionsmechanismus.

Es wurden Oligonukleotide (lt. Tab.2.1) einer Länge von 39 bp verwendet, welche entsprechend zur Template-DNA mittig die Modifikation eines Triplets enthielten. Dies gewährleistet eine spezifische Anlagerung und führt zum Einbau des veränderten Triplets. Es wurde bei der Erstellung des Oligonukleotids der Codongebrauch von *E.coli* beachtet. Dazu wurde die Codon usage Database (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>) verwendet, um eine dem Stoffwechsel von *E.coli* optimal angepasste Mutation der Aminosäure zu erhalten. Mit sekundärer Priorität wurde darauf geachtet möglichst wenige Stickstoffbasen zu verändern.

Die PCR erfolgte analog zu Punkt 2.1 .Es wurde immer mit der Turbopfu® Polymerase (1000 bp/min, Stratagene, La Jolla, USA) gearbeitet, um die „Proof Reading“-Funktion, also einer Korrekturfunktion die zu einer hohen Genauigkeit bei der Bildung des Komplementärstrangs führt, auszunutzen. Die Extensionszeit der PCR war abhängig von der Größe des Vektors mit Insert-DNA. Die Eigenschaft von *E.coli* DNA zu methylieren nutzte man anschließend aus um mit der Restriktase DpnI die ursprüngliche Plasmid-DNA abzubauen. Somit erreicht

2 Material und Methoden

man eine hohe Reinheit der mutierten DNA was mit in einer hohen Robustheit der Methode einhergeht.

2.3.8 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung der DNA wurde von den Firmen GATC (Konstanz) und MWG Biotech (Ebersbach) durchgeführt. Dazu wurden Plasmidpräparationen auf die von den Firmen geforderten Konzentration (50 bis 100 ng/µl) eingestellt. Die Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Lasergene® (DNASTAR Inc., Madison, USA) Software-Pakets selbst zusammengestellt und bei den Firmen in Auftrag gegeben. (siehe Tabelle 4)

Tabelle 4 Sequenzierungsoligonukleotide

Nummer	Sequenz	Awendung
MW34 fwd	AGAGTTATTTTACCACTCCCT	IBA7 fwd
MW34 rev	GACGCAGTAGCGGTAACG	IBA7 rev
MW35 fwd	GAGTTATTTTACCACTCCCT	lba37fwd
MW35 rev	CGCAGTAGCGGTAACG	lba37rev
MW36 fwd	CTGTTTCTCCATACCCGTT	pBad33 fwd
MW36 rev	GGCTGAAAATCTTCTCT	pBad33 rev
MW93 fwd	CCAAAGCCATGACAA	pBad33 fwd N
MW94 fwd	TTGTGAGCGGATAACAATTC	pACYC-Duet 1 MCS1
MW94 fwd	CCCTGTAGAAATAATTTTGT	pACYC-Duet 1 MCS2

2.3.9 DNA/ Protein Sequenzanalyse und Recherche

Die digitalen DNA-Rohsequenzdaten der Sequenzierer wurden mit dem Programm Seqman™ (DNASTAR Inc., Madison, USA) analysiert, um sequenzierter DNA mit dem Gen tps10 zur Kontrolle der Mutagenese und Klonierung zu vergleichen. Sequenzalignments von TPS10 mit anderen Sesquiterpensynthasen wurden mit MegAlign™ (DNASTAR Inc.) und MultAlin <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/> (Corpet 1988) durchgeführt. Bei MegAlign wurde zur Verbesserung der Ausrichtung die im Programm inkludierte ClustalW Methode verwendet (Thompson et al. 1994). Im Internet wurden die Seiten des EMBL (European Molecular Biology Laboratory) <http://www.embl.de/>, NCBI (National Center for Biotechnology Information) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> und der RCSB PDB (Research Collaboratory for Structural Bioinformatics Protein Data Bank) <http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do> zur Datenbankrecherche und Sequenzvergleich genutzt. Proteinspezifische Daten wie die molare Masse wurden mit einem Peptid-Rechner der Northwestern University (Evanston, USA) <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>.

2.4 Elektrophorese und Transfertechniken

2.4.1 DNA-Agarosegelelektrophorese

Eine Auftrennung von DNA-Gemischen erfolgt in 1 %igen-Agarosegelen (1 % Agarose [g/V] Carl Roth GmbH, Karlsruhe), 1 µg/ml Ethidiumbromid, 0,5x TAE-Puffer: 40 mM Tris-HCL pH 8.2, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA). Die Probenvorbereitung erfolgte durch Aufnahme in einen Probenpuffer (50 % Glycerin [v/v], 0,05 % Bromphenolblau [g/v], 100 mM EDTA). 10-15 µl Probe wurden pro Geltasche aufgetragen und anschließend bei einer Spannung von

2 Material und Methoden

100 V, 25 min in einem mit 0,5x TAE-Puffer gefüllten Mupid-One® (Nippongenetics, Düren) aufgetrennt. Die Auswertung und Digitalisierung der unter UV-Licht sichtbaren Banden erfolgte in der Syngene G-Box (Syngene Ltd, Cambridge, UK). Die Eigenschaft von Ethidiumbromid zwischen DNA-Basen zu interkalieren und dabei die Fluoreszenzintensität stark zu erhöhen, wird bei der Auswertung ausgenutzt. Auch eine relative Quantifizierung ist durch direkte Korrelation von Intensität zur DNA-/ RNA-Konzentration möglich. (Aaij and Borst 1972)

2.4.2 SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE wird Natriumdodecylsulfat als anionisches Detergenz zur Überlagerung der Eigenladung von Proteinen eingesetzt, welche dadurch eine negative Ladung bekamen. Daher wurden die Proteinproben mit einem 2x Proteinprobenpuffer (100 mM Tris-HCl pH 6.0, 4 % [g/V] SDS, 10 % [V/V] 2-Mercaptoethanol, 20 % [V/V] Glycerol, 0,1 % [g/V] Bromphenolblau) aufgenommen. Durch zusätzliches Aufkochen über 10 min bei 95 °C wurde die Denaturierung und Linearisierung der Proteine gewährleistet. Disulfidbrücken wurden durch Einsatz von 2-Mercaptoethanol oder Dithiothreitol im Probenpuffer reduziert. Dadurch war nun eine gerichtete Auftrennung von Proteingemischen nach Molekülgröße entlang eines elektrischen Feldes (100 V Sammelgel, 200 V Trenngel) möglich. Als Trennmatrix wurde ein geschichtetes Polyacrylamidgel verwendet. Dies diente zur Konzentrierung des Proteingemischs an einer Grenzfläche unterschiedlicher pH-Werte. Das neutrale Sammelgel (0,125 M Tris-HCl pH 6.8, 4 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1) Carl Roth GmbH (Karlsruhe), 0,1 % SDS [g/v], 0,075 % APS [g/v], 0,05 % TEMED [v/v]) grenzt an dem basischen Trenngel (0,375 M Tris-HCl pH 8.8, 12 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 0,1 % SDS [g/v], 0,075 % APS [g/v], 0,05 % TEMED [v/v]). Durch die geringere Polyacrylamidkonzentration im Sammelgel konnten Proteine schneller an die Grenzfläche wandern und wurden dort konzentriert.

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in der Mini-Protean® (BioRad, Hercules, USA) einem Tank-System. Der Tank wurde mit einem SDS - haltigen Tris-Glycin Puffer (200 mM Tris-HCl, 1,9 M Glycin, 10 % [g/V] SDS) nach Laemmli (Laemmli 1970) befüllt und die gepackte Blot-Apparatur eingesetzt.

Die aufgetrennten Proteine wurden zunächst 2 h mit einem Färbepuffer (45 % Methanol [v/v], 7% Essigsäure [v/v], 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250® [g/v] (Sigma-Aldrich, St. Louise, USA)) versetzt und anschließend 4 h mit Entfärbepuffer (5 % Methanol [v/v], 7 % Essigsäure [v/v]) inkubiert. Die Dokumentation der Proteinbanden erfolgte mit Fotos einer digitalen Spiegelreflexkamera (D5000, Nikon GmbH, Düsseldorf) und die Auswertung anhand dieser Bilder.

2.4.3 Protein-Transferblot/ Western-Blot

Der Proteintransfer nach der SDS-PAGE siehe Punkt 2.4.2 erfolgte auf eine Nitrocellulosemembran (Roti®0.2 Carl Roth GmbH, Karlsruhe). Vorbereitend wurden Filterpapiere (Whatman®) in Blot-Puffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris-HCl, 20 % MeOH ad 100 % aqua dest.) 20 min äquibriert und die Nitrocellulosemembran in Methanol gewaschen. Anschließend wurde die Apparatur zusammengesetzt (Abb.9) und die Proteine bei konstant 100 V, 3 h im Mini-Protean (BioRad, Hercules, USA) und vollständiger Einbettung in Blot-Puffer transferiert.

2 Material und Methoden

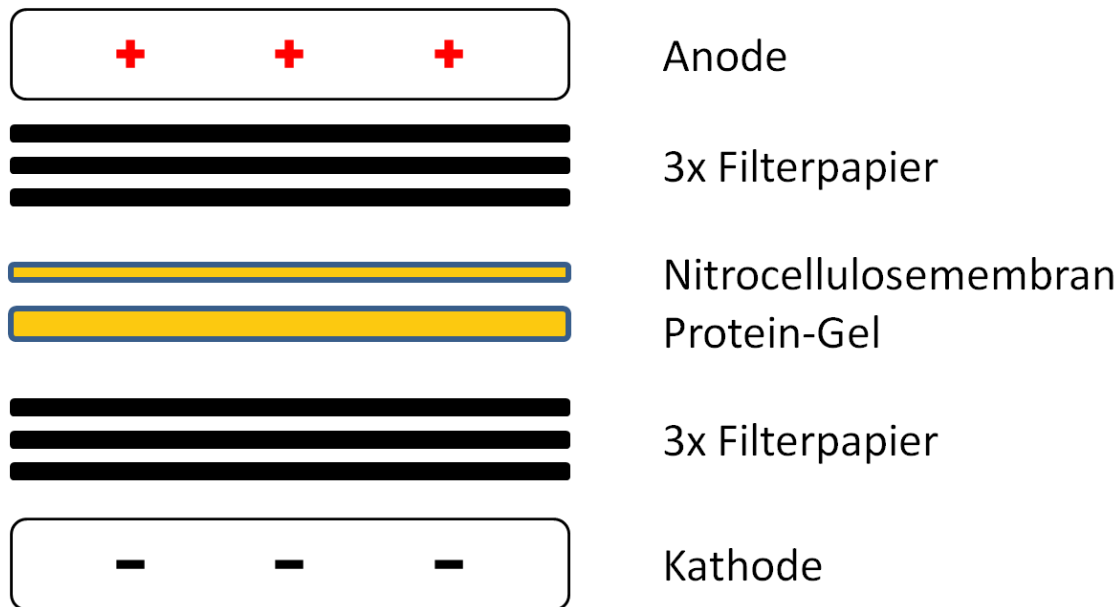


Abb. 9 Schematischer Aufbau des Western-Blot

2.4.4 Hybridisierung von AK-gestützten Markern

Zur Detektion der TPS10 Proteinbanden wurde die Nitrocellulosemembran 30 min in einer Blockierungslösung (2 % BSA, TBST-Puffer: 10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) mit der Membranoberseite nach oben inkubiert. Dies hatte den Zweck, unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Anschließend wurde mit dem aus Kaninchen stammenden TPS10 spezifische Antikörper (Eurogentec (Seraing, Belgien) 1h unter Schütteln (50 U/min) inkubiert. Der primäre Antikörper wurde entfernt und die Membran dreimal mit TBST-Puffer in einer Petrischale gewaschen. Danach wurde mit dem sekundären Antikörper (IgG-AP, sc2959 Lot#1207, 400 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg) 1 h unter Schütteln (50 U/min) inkubiert. Dieser sekundäre Antikörper (Huhn) und bindet hochspezifisch an die Fc-Region des primären AK (Kaninchen) und trägt als Reporterezym eine alkalische Phosphatase. Am Ende der Inkubation wurde dreimal mit TBST-Puffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween 20) gewaschen und anschließend 1 ml einer NBT/ BCIP haltigen Lösung auf die Nitrocellulosemembran pipettiert. Nach einer kurzen Inkubation unter Lichtausschluss erfolgte die Detektion der TPS10-Bande unter Tageslicht.

2.5 Proteintechniken

2.5.1 Synthese (Expression) rekombinanter Proteine

Die Synthese von Sesquiterpensynthasen wurde in *E.coli* realisiert, wobei sich die Wahl des *E.coli*-Stamms an den verwendeten Vektor orientierte. Das Gen und Fragmente des Gens *tps10* aus der Maislinie B73 wurden hauptsächlich in die Vektoren pASK-IBA37⁺, pASK-IBA33⁺ kloniert, welche sich vor allem durch die Lage des Histidin-Tags unterscheiden. Für Co-Expressionen fanden zusätzlich Klonierungen in den Vektor pBad33 statt. Die *E.coli* RNA-Polymerase des TOP10 Stamms ist bei diesen Vektoren in der Lage den Promoter zu

2 Material und Methoden

erkennen und das Gen abzulesen. Somit fiel die Wahl auf *E.coli* TOP10, da dieser lagerstabil und einfach in der Handhabung ist. Bei der Klonierung vom Gen *tps10* und seinen Mutanten in den Duet-Vektor pACYC-Duet-1 wurde der *E.coli* Stamm BI21(D3) verwendet. Die Expression des Gens steht hier unter Kontrolle eines T7-Promoters, welcher von der in BI21(D3) RNA-Polymerase abgelesen werden kann. (siehe Tabelle 2.4)

Die Expression wurde mit einer Submerskultur (5 bis 50 ml) des gewünschten Klons über Nacht eingeleitet. Am Folgetag konnte damit ein Volumen von 100 ml bis 3 l LB-Medium mit entsprechend konzentriertem Antibiotikum/ Antibiotika überimpft werden. Die Größe des Ansatzes richtete sich nach der Aufgabenstellung. So waren 100 ml ausreichend für die Analyse der Mutagenesen und Klonierungen, 3 l wurden für weitergehende Proteinuntersuchungen verwendet. Die überimpften Kulturen wurden bei 37 °C im Schüttler (220 U/min) bis zu einer OD600 von ca. 0,5 kultiviert, anschließend mit Anhydrotetracyclin (200 µg/l) bzw. IPTG (1 mM) induziert und bei 18 °C, 16 h im Schüttelinkubator (220 U/min) inkubiert.

Zur Aufarbeitung wurde die Bakterienkultur 20 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Das LB-Medium wurde verworfen und das Sediment in einem Extraktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 % Glycerol, 5 mM MgCl₂, 5 mM Na-Ascorbat, 5 mM DTT, 0,5 mM PMSF) aufgenommen. Die folgende Ultraschallbehandlung (4x 20 s, Branson Sonifier 250, Danbury, USA) diente dem Zellaufschluss. Optional wurde bei den 3 l Kulturen vor der Ultraschallanwendung 1 h mit 10 mM Lysozym (Merck, Darmstadt) und 30 µl DNase (Fluka, Sigma-Aldrich) inkubiert.

Die Zellwandbestandteile wurden danach in der Kühlzentrifuge (20 min, 14000 U/min) sedimentiert und der Überstand mit dem gelösten Protein abgenommen. Dieser wurde mit Econopac 10DG-Säule (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) in Assaypuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 % Glycerol, 1 mM DTT) umgepuffert. Die Aufarbeitung wurde unter permanenter Kühlung und gekühlten Puffern durchgeführt. Eine Lagerungstemperatur von -20 °C für kurze und -80 °C für lange Zeiträume stellten sicher, dass keine relevanten Aktivitätsverluste auftraten.

2.5.2 Affinitätschromatische Proteinreinigung

Für die Proteincharakterisierung sind hochreine Proteinlösungen wichtig. Die Herstellung mit Histidin markierter Proteine erfolgte wie unter Punkt 2.5.1. Rohextrakte aus 100 ml Kulturen wurden über Säulen des Ni-NTA-Spin-Kit (Qiagen, Hilden) gemäß der Gebrauchsanleitung gereinigt. Rohextrakte aus 3 l Kulturen wurden mit 4 ml Profinity™ IMAC (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA), einem nickelhaltigen Harz, inkubiert (1 h, 4 °C). Das Harz wurde zuvor zweimal mit einem Säulenvolumen Äquilibriumspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol pH 8.0, 1 % Tween 20 [v/v], 10 % Glycerol [v/v]) unter schütteln äquilibriert und der Überstand jeweils verworfen. Nachfolgend sedimentierte das Harz mit dem gebundenen Protein in Chromatographiesäulen (Poly Prep, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Das Harz wurde dreimal mit einem Säulenvolumen Äquilibriumspuffer gewaschen und anschließend das Protein mit 4 ml Elutionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM NaCl, 250 mM Imidazol pH 8.0, 1 % Tween 20 [v/v], 10 % Glycerol [v/v]) eluiert.

2 Material und Methoden

2.5.3 Proteinquantifizierung

2.5.3.1 Proteinquantifizierung nach Gill und von Hippel

Die Proteinquantifizierung nach (Gill and von Hippel 1989) basiert auf der Korrelation zwischen dem Extinktionskoeffizienten des nativen Proteins zum Verhältnis Absorption des nativen Proteins mal Extinktionskoeffizient des denaturierten Proteins zur Absorption des denaturierten Proteins.

$$\epsilon_{280, \text{nat}} = (A_{280, \text{nat}} * \epsilon_{280, \text{denat}}) / A_{280, \text{denat}}$$

$\epsilon_{280, \text{denat}}$ wird dabei aus der Summe der Extinktionskoeffizienten aller (a)Tyrosine, (b)Tryptophane und (c)Cysteine gebildet.

$$\epsilon_{280, \text{denat}} = a\epsilon_{\text{Tyr}} + b\epsilon_{\text{Trp}} + c\epsilon_{\text{Cys}}$$

Bestimmt wurde der Extinktionskoeffizient des denaturierten Proteins mit dem Proteinrechner <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>. Dieser beträgt für TPS10 der Maislinie $77440 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$. Die Berechnung von $\epsilon_{280, \text{nat}}$ erfolgte durch die Bestimmung der UV-Extinktionen eines in 6 M Guanidin-HCl denaturierten Proteins und eines nativen Proteins und der theoretischen Berechnung des $\epsilon_{280, \text{denat}}$. Dies ergab einen $\epsilon_{280, \text{nat}}$ von $47017 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten des nativen Protein vereinfacht die Konzentrationsbestimmung von gereinigten Proteinlösungen deutlich, da eine Bestimmung der UV-Absorption bei 280 nm leicht und proteinsparend durchgeführt werden kann und sich die Konzentration verlässlich nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz bestimmen lässt.

2.5.3.2 Proteinquantifizierung nach Bradford

Die Proteinquantifizierung nach BRADFORD (1976) erfolgte in 96-well Mikrotiterplatten mit dem Roti®-Quant-Reagenz (Carl Roth, Karlsruhe). Dazu wurde zunächst eine BSA-Eichgrade entsprechend Tabelle 5 und Verdünnungen der Proteinproben (1:20, 1:40) erstellt. Davon wurden jeweils 2x 50 μl auf die 96 Well-Platte aufgetragen. Eine Verdünnung von 2 Teilen Roti®-Quant (5x) in 5,5 Teile Wasser wurde ebenfalls in ausreichender Menge vorbereitet und davon 200 μl zu den Proben pipettiert. Nach 5 min Inkubation wurde die OD_{590} mit dem Tecan®Infinite200 bestimmt. Die Berechnung des Proteingehalts erfolgte anhand der BSA-Eichgerade.

Tabelle 5 Schema zur Erstellung einer Eichgerade mit BSA nach Roti®-Quant

BSA ($\mu\text{g/ml}$)	μl der BSA-Stammlösung	aqua dest. in μl
0	-	110
20	40 μl aus 100 $\mu\text{g/ml}$	160
30	45 μl aus 100 $\mu\text{g/ml}$	105
40	80 μl aus 100 $\mu\text{g/ml}$	120
50	60 μl aus 100 $\mu\text{g/ml}$	60
60	120 μl aus 100 $\mu\text{g/ml}$	80
80	160 μl aus 100 $\mu\text{g/ml}$	40
100	200 μl aus 400 $\mu\text{g/ml}$	600

2 Material und Methoden

2.5.4 Computergestützte Bestimmung des Molekulargewichts

In der vorliegenden Arbeit wurde darauf verzichtet das Molekulargewicht von TPS10 der Maislinie B73 experimentell über die Fraktionierung eines Rohextrakts nach Punkt 2.5.1 durch Gelfiltration nachzuweisen.

Stattdessen genügte die Berechnung durch nicht kommerzielle Proteinrechner wie <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html>. Durch Vergleich der TPS10 Proteinbande (61,5 kg/mol bzw. 61,5 kDa) mit den Markerproteinen (BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder, Invitrogene, Carlsbad) der SDS-PAGE (BSA: 66 kDa) zeigte sich die Zuverlässigkeit der Proteinrechner.

2.5.5 Aktivitätsbestimmung

Die Aktivitätsbestimmung wurde in der Regel mit Rohextrakten der in *E.coli* heterolog exprimierten Proteine siehe Punkt 2.5.1 zeitnah zur Proteinsynthese durchgeführt. In der Regel wurde eine Stammlösung angefertigt, welche für jede Probe 2 µl eines Substrats (GPP, *E,E*-FPP, *Z,E*-FPP, 440 ng/µl, Echelon Research Laboratories, Salt Lake City, USA), 5 µl MgCl₂ (0,1 M), 63 µl Assaypuffer (siehe Punkt 2.5.1) enthielt. Abb.10. Die Stammlösung wurde in 1,5 ml Glasgefäße (Macherey-Nagel, Düren) aliquotiert und auf Eis gelagert. 30 µl partiell gereinigter Proteinlösung wurde zum Start der Reaktion zugefügt und das Gefäß mit einem Septum verschlossen. Zur Isolierung der STKW wurde eine Polydimethylsiloxan-SPME-Faser (PDMS-100 µm, Supelco, Bellafonte, USA) in das Gefäß über das Septum eingebracht und im Wasserbad (30 °C, 20 min) inkubiert.

SPME- Fasern unterlagen in der Praxis oft Sättigungseffekten, was zu Problemen bei der Quantifizierung führte. Sesquiterpene stellen ein sehr heterologes Feld von Kohlenwasserstoffen mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften dar. Bei der Quantifizierung von Sesquiterpenen geht es um die jeweilige Bindungsaffinität zur Faseroberfläche. Das konnte bei einer Sättigung der Extraktionsmatrix zu Verdrängungseffekten zwischen den Terpenen führen. Damit wäre eine eindeutige Analyse nicht in jedem Fall möglich und die Extraktion von volatilen Sesquiterpenen mittels SPME-Faser aus der Gasphase im Reaktionsgefäß bedurfte der Überprüfung durch die quantitativ eindeutigere Methode der Flüssigextraktion. Die apolaren Sesquiterpene aus TPS10 lösen sich sehr gut in apolaren Lösungsmitteln wie Hexan.

Daher wurde die Reaktion mit 1 ml Hexan überschichtet und inkubiert. Die wäßrige Phase wurde mit flüssigem Stickstoff gefroren und die organische Phase mit einer Glaspipette separiert.

Die gaschromatographische Analyse erfolgte im Anschluss laut Punkt 2.5.6.

2 Material und Methoden

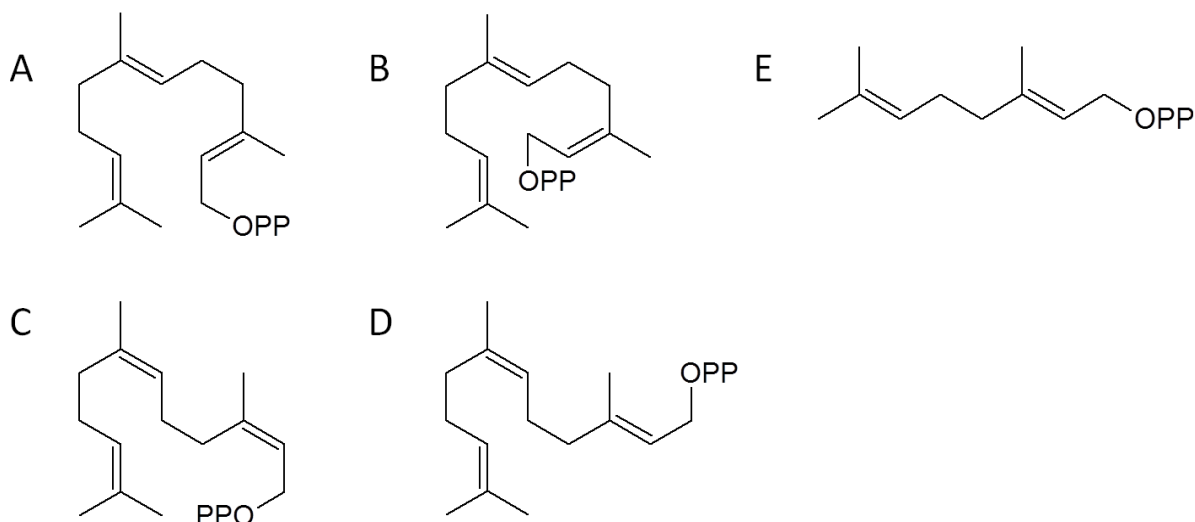


Abb. 10 Übersicht der eingesetzten Substrate

Die in dieser Arbeit verwendeten Substrate waren A (*E,E*)-FPP, B (*Z,E*)-FPP, C (*Z,Z*)-FPP, E GPP. D (*E,Z*)-FPP war leider im Rahmen dieser Arbeit nicht verfügbar. Zur Übersicht wurden die 2D-strukturen mit ACD/ChemSketch erstellt.

2.5.6 GC/MS GC/FID von Terpenen

Die bei 2.5.5 erhaltenen Terpengemische wurden mit einem Gaschromatographen GC2010 (Shimadzu Europe, Duisburg) mit einem angeschlossenen Massenspektrometer GC2010-QPlus (Shimadzu Europe, Duisburg) getrennt und ausgewertet. Das Trägergas Wasserstoff wurde kontinuierlich über einen Wasserstoffgenerator bereit gestellt. Der GC-Injektor wurde auf 220 °C temperiert, die Flussgeschwindigkeit des Trägergas betrug 1,0 ml/min, als Säule wurde eine Econo-Cap™ EC™-5 ((5 % Phenyl)- 95 % methylpolysiloxan, Länge: 30 m, Filmdicke: 0,25 µm, Innendurchmesser: 0,25 µm) der Firma Grace Dawison (Deerfield, USA) verwendet. Das Injektionsvolumen (2 µl, splitless) wurde über den Autoinjektor AOC-20i injiziert, als Autosampler wurde der AOC-20s verwendet. Bei der direkten Injektion über SPME-Fasern (100 µm Polydimethylsiloxan, Supelco, Bellafonte, USA), wurde manuell injiziert.

Zur Auftrennung der STKW wurde 80 °C Säulentemperatur angelegt und 3 min konstant gehalten. Anschließend wurde die Temperatur zur Auftrennung langsam um 7 °C/min bis auf 200 °C und am Ende um 100 °C/min bis 300 °C erhöht und 2 min zur Regeneration der Säule konstant gehalten. Bei der Analyse von Monoterpenen wurde die Ausgangstemperatur auf 50 °C gesenkt und um 7 °C/min bis 150 °C erhöht. Die Regeneration erfolgte analog zu STKW.

Das Massenspektrometer wurde mit folgenden Einstellungen betrieben. Quadrupol-Temperatur 200 °C, Transferline-Temperatur 250 °C, Ionisierungspotential 70 eV, Scan-Bereich: 46-350 Atommasseneinheiten.

Zur Quantifizierung der Terpenproben wurde parallel zum Massenspektrometer, ein Flammenionisationsdetektor (FID) über eine zweite Chromatographie-Säule betrieben. Somit gelten die oben beschriebenen Einstellungen für die Chromatographie analog. Als inertes Make-up-Gas wurde Helium verwendet. Die Detektortemperatur des FID lag bei 250 °C.

2.5.7 Terpenidentifizierung

Nach der GC-chromatischen Trennung der Terpengemische wurden die Substanzen Massenspektren mit verschiedenen Massenspektrenbibliotheken verglichen. Dazu wurde das Analyseprogramm „Post-Run-Analysis“ von Shimadzu mit dazugehöriger Datenbank, die „Robert P. Adams“-Bibliothek sowie die „Wiley8“-Bibliothek verwendet. Eine eindeutige Identifizierung der Einzelsubstanzen durch Abgleich der Retentionszeiten und spezifischer Verteilung der Massenfragmente von authentischen Standards wurde in Vorarbeit durch Herr Dr. T. G. Köllner (Köllner, Gershenzon et al. 2009) durchgeführt.

2.5.8 Computergestützte Proteinstrukturanalyse

Basierend auf der bekannten dreidimensionalen Struktur der 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS) aus Tabak (Starks, Back et al. 1997) und der (+)-Delta-Cadinensynthase (DCS) aus Baumwolle (Gennadios et al. 2009) wurden Homologiemodelle mit Swiss-Model <http://swissmodel.expasy.org/> (Arnold et al. 2006) berechnet. Trotz der größeren Homologie auf Ebene der Aminosäuresequenz mit TPS10 (35 % TEAS, DCS 38 %), wurde TEAS aufgrund der funktionellen Verwandtschaft Ausgangsstruktur verwendet.

Die Visualisierung der so entstandenen Homologiemodelle erfolgte vorrangig mit UCSF Chimera <http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/> (Pettersen et al. 2004) und PyMol (Python-enhanced molecular graphics) (Pymol). Der Swiss-PDBViewer <http://swissmodel.expasy.org/> (Guex and Peitsch 1997) eignete sich außerdem zur Berechnung von Bindungslängen und Abständen zwischen Aminosäuren und funktionellen Gruppen. Somit konnten mögliche Wasserstoffbrückenbindungen und π - π - Interaktionen besser identifiziert werden. Darstellungen von zweidimensionalen Molekülen wurden mit ChemDraw (Perkin Elmer, Cambridge, USA) und ACD/ChemSketch 12.0 (Advanced Chemistry Development 2012) umgesetzt.

Zur spezifischeren Untersuchung der Substrat-Protein-Bindungen wurde das Programm Autodoc Vina1.5.4 (Trott and Olson 2010) eingesetzt. Damit konnten Substrate siehe Punkt 2.5.5 in das Proteinmodell eingepasst werden. Dies führte zur besseren Aufklärung der Bindungsmodi in TPS10, was zur Stützung von Thesen zum Reaktionsmechanismus diente.

2.5.8.1 Verfeinerung des Homologiemodells

Die Einpassung der Substrate und Intermediate wurde von J. Sczcesny, im Rahmen einer Diplomarbeit, der AG W. Brandt vom Leibniz Institut für Pflanzenbiochemie durchgeführt (Sczcesny 2011). Dabei wurden die Softwarepakete Molecular Operating Environment (MOE) (Chemical Computing Group 2012), YASARA Structure (Krieger et al. 2002) und SYBYL (SYBYL 2006) eingesetzt, um ein Homologiemodell erstellen, bearbeiten und validieren zu können. Weiterführend wurden die Intermediate und Substrate in das validierte Modell eingepasst und Berechnungen der Bindungsenergien durchgeführt.

Im Detail wurde zunächst in der PDB-Datenbank (Protein Data Bank) ein BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) durchgeführt. Die höchste Übereinstimmung ergab wie unter Punkt 2.5.8 die (+)-Delta-Cadinensynthase aus Baumwolle (Gennadios, Gonzalez et al. 2009), welche daher als Ausgangsstruktur für das TPS10-Homologiemodell genutzt wurde.

2 Material und Methoden

Damit wurde nun Übergangsmodelle gemäß der Boltzmann-Zufalls-Prozedur, die potentielle Wasserstoffbrücken, das Peptidrückrat und Seitenketten berücksichtigt, die aus Erfahrungswerten einer Bibliothek von hochauflösenden Proteinstrukturen stammten, erstellt. Diese Übergangsmodelle bedurften der Optimierung hinsichtlich Energieminimierung, Wechselwirkungen zwischen funktionellen Gruppen und sterischen Gegebenheiten. Um eine optimale Validierung zu erreichen wurden folgende Strukturvalidierungsprogramme eingesetzt:

ProSAIL (Protein Structure Analysis), betrachtete den Faltungszustand des Proteins indem es Energiegraphen erstellt. Dazu werden C^α - C^β -Atompotentiale und Oberflächenpotentiale des Modells berechnet und als Z-Score zusammengefasst.

PROCHECK (Laskowski et al. 1993) überprüfte mit Hilfe des Ramachandran-Plots die Stereochemie des Modells. Dabei gingen Bindungswinkeln, und -längen, sterische Behinderungen der Haupt- und Seitenketten, sowie die Planarität der Peptidbindungen, im direkten Vergleich zu hochauflösenden Strukturen in die Berechnung ein.

ERRAT (Colovos and Yeates 1993) untersuchte die stereochemische Qualität des Proteins im Vergleich zu hochauflösenden Strukturen der Datenbanken über nicht kovalente Atom-Atom-Beziehungen. Damit berechnete es über eine quadratische Funktion einen Fehlerwert.

Die weitere Optimierung gelang über schrittweise Energieminimierung des Proteins. Dies wurde durch verschiedene Algorithmen erreicht, bei denen die Positionen aller Atome oder eines Teils variiert wurde um das nächste Minimum zu erreichen. Die Algorithmen wurden durch verschiedene, statistisch ermittelte Standardwerte für Bindungslänge und -Winkel, sowie des Torsionswinkels verändert. Diese Standardwerte sind in sogenannten Kraftfeldparametern enthalten und aufgabenspezifisch. Das Kraftfeld Charmm22 (mit Born Solvation) von MOE ist besonders für das Gesamtprotein wie TPS10 geeignet. Es wurde bei der Energieminimierung nur genutzt, wenn mit YASARA2 zu ungenügenden Ergebnissen führte. SYBYL eignete sich zur Bestimmung der Thermodynamik und Minimierung kleinerer Moleküle (z.B. Substrate). Das Kraftfeld YASARA2 von YASARA wurde genutzt um Fehler in der Struktur zu beseitigen, indem die Flexibilität bis zu drei Aminosäuren neben der fehlerhaften Bindungslänge, -winkel erhöht wurde.

Nach der Strukturoptimierung wurden Substrate und Intermediate von TPS10 mit PLANTS (Protein Ligand ANT System) (Korb et al. 2006) in die Bindetasche des aktiven Zentrums eingepasst. Dazu wurden der Ligand und einige Seitenketten im aktiven Zentrum flexibel gehalten und die Bindetasche mit Koordinaten definiert. Danach wurden pro Ligand (Substrat, Intermediat) 30 mögliche Positionen (Konformationen) in der Bindetasche erstellt. War dies mit PLANTS nicht möglich wurde alternativ mit GOLD aus MOE oder GLIDE gearbeitet. Die Bewertung erfolgte abschließend anhand des Abstands Ligand zu katalytisch wichtigen Aminosäuren. Der Score-Wert hatte nur sekundär Bedeutung. (Szczyesny 2011)

2.5.8.2 Bestimmung der theoretischen Thermodynamik

Die Produkte und kationischen Intermediate aus dem TPS10 Reaktionsmechanismus (Köllner, Gershenzon et al. 2009) wurden mit der semiempirischen PM3-Methode aus SYBYL energetisch minimiert. Die Berechnung der Reaktionsenthalpie $\Delta_R H$ erfolgte durch

2 Material und Methoden

Subtraktion der Standardbildungsenthalpie der Produkte von den Edukten ($\Delta_R H = \Delta_B H_{\text{Produkte}} - \Delta_B H_{\text{Edukte}}$). Die Angabe erfolgte in kcal/mol. Freie Enthalpien wurden nicht berechnet. (Szczyzny 2011).

2.5.9 Fluoreszenzspektroskopische Untersuchung denaturierter Proteine

Terpensynthasen wurden laut Punkt 2.5.1 in *E.coli* exprimiert und direkt im Anschluss nach Punkt 2.5.2 durch Affinitätschromatographie gereinigt. Aufgrund der geringen Lagerstabilität des gereinigten Proteins wurden Denaturierungsexperimente immer am Folgetag der Proteinaufreinigung durchgeführt.

Die tagesaktuelle Proteinkonzentration wurde mit einem Zweistrahlphotometer JascoV-60 Spectrometer (Gross-Umstadt) gemessen. Durch Refraktometrie wurde die genaue Konzentration $c_{\text{Guanidin-HCl}}$ im Denaturierungspuffer (6 M Guanidin-HCl in Assaypuffer) bestimmt.

Zur Berechnung diente folgende empirische Formel nach (Nozaki 1972).

$$c \text{ in mol/l} = 57,147 * \Delta n + 38,68 * \Delta n^2 - 91,6 * \Delta n^3$$

Δn stellt dabei die Differenz zwischen dem Brechungsindex des Denaturierungspuffers und dem Assaypuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 % Glycerol, 1 mM DTT) dar. Anhand der Konzentrationen wurde vorab mit Hilfe einer selbsterstellten Excel-Vorlage ein Pipettierschema erstellt. Der Proteingehalt (1,0 μM) blieb konstant, der Gehalt an Guanidin-HCl umfasste den Bereich von 0,0 M bis 6,0 M, bei gleichmäßiger Probenverteilung. Dies bedeutet Abstände von 0,2 M bis 0,4 M zwischen den einzelnen Proben. Nach Abschluss der Vorbereitungen wurde anhand eines festen Zeitplans in Abständen von 4 min mit der Proteinlösung inkubiert (55 min, 30°C, Wasserbad). Direkt nach der Inkubation wurden die Proben in Quarz-Küvetten mit einem Fluoreszenzspektrometer Jasco-FP-6500 (Gross-Umstadt) vermessen. Die Anregungswellenlänge (280 nm), mittlere Geschwindigkeit (50 nm/min) und Sensitivität wurden zuvor eingestellt. Die Emissionsstrahlung wurde im Bereich 310 nm bis 420 nm aufgezeichnet. Die Emissionsspektren wurden mit der Auswertungssoftware von Jasco übereinander gelegt, um die bathochrome Verschiebung des Emissionsmaximum bei steigender Guanidinkonzentration erkennen zu können.

2.6 Statistische Methoden

Um die statistische Relevanz der Daten zu berechnen wurde die Methode der einfaktoriellen ANOVA (Analysis of Variance) angewendet. Im Anschluss wurde eine paarweise Vergleichsprozedur (Post-Hoc Tests) nach der Holm-Sidak-Methode durchgeführt. Diese beruhen auf dem Vergleich multipler Mittelwerte, um signifikante Unterschiede zwischen den Faktoren erkennen zu können. Die Normalverteilung und die Varianz wurden geprüft. Der Signifikanzunterschied betrug maximal $p < 0,05$.

2 Material und Methoden

2.7 Anmerkungen

Die verwendeten Chemikalien stammten wenn nicht anders erwähnt von der Carl Roth GmbH in Karlsruhe.

Mikrobiologische und molekularbiologische Techniken wurden bei nicht gesonderter Erwähnung nach Maniatis (Molecular cloning) von Joseph Sambrook (Sambrook 1989) durchgeführt.

3 Ergebnisse

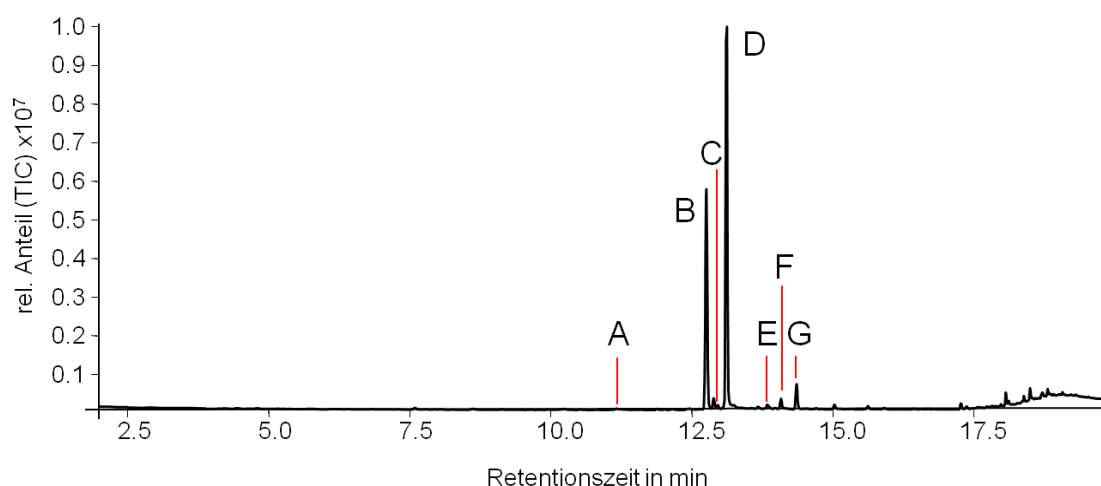
3 Ergebnisse

3.1 Allgemeine Ergebnisse zu TPS10

3.1.1 Einordnung TPS10

3.1.1.1 Substrate

Die Terpensynthese 10 dient der Maispflanze zur Verteidigung gegen Fraßfeinde indem ein charakteristisches Gemisch aus Sesquiterpenkohlenwasserstoffen (STKW) gebildet wird. Die Aufklärung der mechanistischen Zusammenhänge während der Reaktion vom Farnesyldiphosphat (FPP) zu dem charakteristischen Terpenspektrum von TPS10 bildet den Kern dieser Arbeit. Grundlage dafür war der postulierte Reaktionsmechanismus von TPS10 (Köllner, Gershenzon et al. 2009). Dazu wurden zunächst einige grundlegende Untersuchungen durchgeführt welche folgend erläutert werden sollen. Ziel war es, TPS10 in einem robusten Versuchsumfeld qualitativ eindeutig analysieren zu können. Schwerpunkte bildeten dabei die Etablierung eines robusten Expressionssystems, die Optimierung der Proteinanalytik und die Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen für TPS10.



A :	7- <i>epi</i> -Sesquithujen	E :	Zingiberen
B :	(<i>E</i>)- α -Bergamoten	F :	β -Bisabolen
C :	Sesquisabinen A	G :	β -Sesquiphellandren
D :	(<i>E</i>)- β -Farnesen		

Abb. 11 Gesamtdarstellung der nativen STKW-Produktion von TPS10 der Maislinie B73

Das abgebildete Chromatogramm (Total Ion Chromatogramm (TIC)) zeigt eine Auftrennung aller relevanten Sesquiterpene durch GC-MS. TPS10 wurde mit (*E,E*)-FPP, 20 min, bei 30 °C inkubiert. Dieses Chromatogramm war repräsentativ für alle weiteren Chromatogramme der standardisierten GC-MS-Methode hinsichtlich Retentionszeit und Auftrennung der Einzelsubstanzen.

3 Ergebnisse

Zur Untersuchung des STKW-Gemischs wurde das Gen *tps10* aus juvenilen Blättern isoliert (Schnee, Köllner et al. 2006). Nach Amplifizierung und Klonierung wurde TPS10 überexprimiert und partiell gereinigt. Dieser Rohextrakt wurde für 20 min in einem geeigneten Puffer mit potentiellen Substraten inkubiert (s.u.). Zur Etablierung einer robusten GC-MS-Methode zur Auftrennung des STKW-Gemisches erfolgte die Inkubation zunächst mit (*E,E*)-FPP bei 30 °C. Das Spektrum der gebildeten Sesquiterpene stimmt mit einem Teilspektrum der Herbivor-induzierten Maispflanzen überein (Abb.11). Die zu untersuchenden Sesquiterpene lagen bei den gewählten Bedingungen bei einer Retentionszeit von 11 bis 15 Minuten. Daher werden folgend die Ausschnitte der Chromatogramme gezeigt.

Zur Aufklärung der mechanistischen Zusammenhänge ist es unter Umständen erforderlich, bestimmte Teile des Reaktionsweges zu umgehen. In der Reaktionskaskade von TPS10 bezieht sich dies vor allem auf die Isomerisierungsreaktion, also die Umwandlung vom transoiden zum cisoiden Farnesylcarbokations. Das cisoides Isomer ermöglicht die Bildung zyklischer Produkte und damit die Vielfalt an Terpenen. Das cisoides (*Z,E*)-FPP ermöglicht die Betrachtung der Reaktionskaskade unter Ausschaltung der Isomerisierung. Das Verhältnis der zyklischen Terpene bleibt dabei erhalten. Daher wurde neben (*E,E*)-FPP, (*Z,E*)-FPP zur Untersuchung von Mutanten mit eingeschränkter Isomerisierungsreaktion verwendet (Abb.12). Weiterführend wurden mit dem Stereoisomer (*Z,Z*)-FPP die Möglichkeiten zur Isomerisierung von TPS10 untersucht.

Die in Abb.12 beschriebenen Sesquiterpene sind bei den verwendeten Substraten (*E,E*)-FPP und dem Stereoisomer (*Z,E*)-FPP identisch. Sie ließen sich strukturell in Aliphaten ((*E*)- β -Farnesen), Monozyklen (β -Sesquiphellandren, β -Bisabolene, Zingiberene) und Bicyklen (α -Bergamotene, Sesquisabine A, 7-*epi*-Sesquithujene) unterteilen. Die Reihenfolge der Nennung bezieht sich auf den Gehalt im Terpengemisch bei Inkubation mit (*E,E*)-FPP. Vergleicht man die Bildung der zyklischen Terpene bei Reaktion mit (*E,E*)-FPP und (*Z,E*)-FPP, so nimmt die Gesamtbildung zyklischer Terpene deutlich zu. Die charakteristischen Anteile der einzelnen Terpene zueinander bleiben erhalten.

3 Ergebnisse

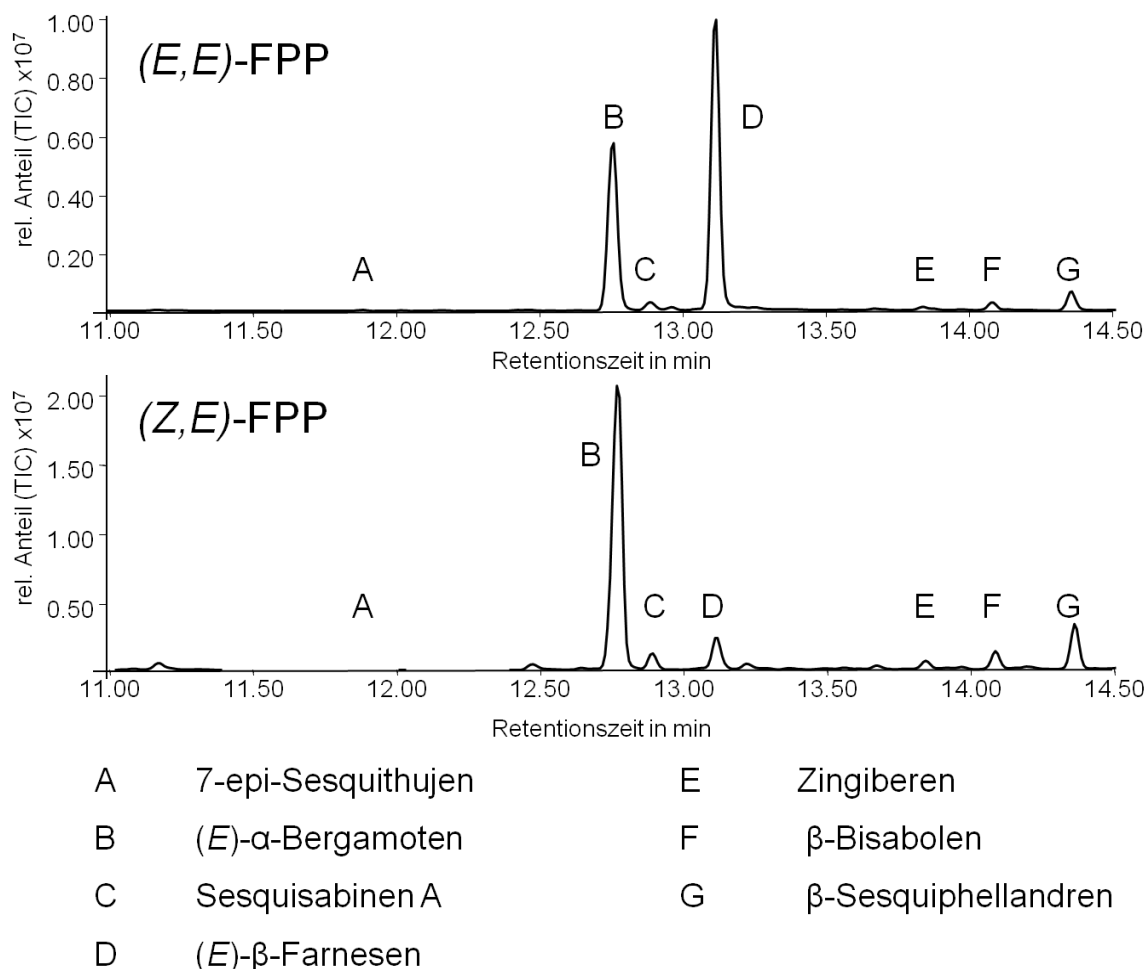


Abb. 12 Ein Ausschnitt der TPS10 Chromatogramme im Bereich der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe von 11 bis 15 min beim Vergleich der Substrate (*E,E*)-FPP und (*Z,E*)-FPP

Das für die Maiszuchtlinie B73 typische STKW-Gemisch wurde in Abb. 12 im Detail analysiert. Beide Chromatogramme stellen die nach Retentionszeit geordneten Sesquiterpene von TPS10 dar. Die Identifizierung erfolgte anhand authentischer Standards und mit Hilfe von Massenfragmentdatenbanken. Das obere Chromatogramm zeigt die Inkubation mit dem natürlichen Substrat (*E,E*)-FPP. Im unteren Chromatogramm erfolgte die Inkubation mit dem synthetischen Substrat (*Z,E*)-FPP. Dieses Substrat wurde im Rahmen der Analyse von mutierten Proteinen mit eingeschränkter Fähigkeit zur Bildung zyklischer Produkte eingesetzt. Dadurch konnten diese Mutanten wieder zyklische Terpene bilden. Bei TPS10 zeigte sich eine Verringerung der Bildung von nicht zyklischen Terpenen.

In Abb.13 sind die Anteile der gebildeten Sesquiterpene bei Inkubation mit den stereoisomeren Substraten gegenübergestellt. Die aliphatischen Anteile ((*E*)- β -Farnesen) liegen bei der Reaktion mit dem natürlichen Substrat (*E,E*)-FPP bei ca. 53 %. Die zyklischen Terpene hatten einen Gesamtanteil von durchschnittlich 47 %. Davon dominiert α -Bergamoten (36,5 % der Gesamtproduktion) die zyklischen STKW. Eine Aufschlüsselung der zyklischen Sesquiterpene ergab die Verteilung α -Bergamoten 78,5 %, β -Sesquiphellandren 11,8 %, β -Bisabolen 3,4 %, Zingiberen 3,1 %, Sesquisabinen A 2,1 % und 7-*epi*-Sesquithujen 1,0 %.

3 Ergebnisse

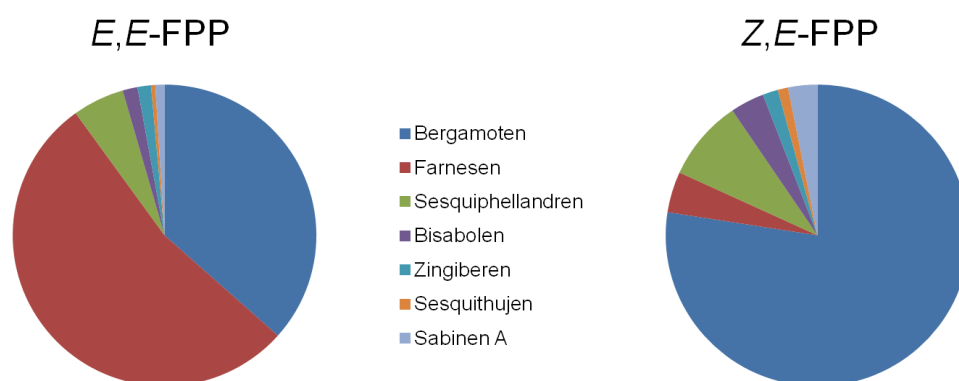


Abb. 13 Bildungsverhältnisse der Sesquiterpenkohlenwasserstoffe von TPS10 nach Inkubation mit (*E,E*)-FPP und (*Z,E*)-FPP

Die Kreisdiagramme zeigen die durchschnittliche Verteilung der Terpenprodukte von TPS10 der Maisinzuchtlinie B73 an der Gesamtbildung. Die Verwendung von stereochemisch unterschiedlichen Substraten führt zu einer veränderten Produktverteilung. Nach Inkubation mit dem natürlichen Substrat (*E,E*)-FPP (links) besteht die Gesamtmenge zu 47 % aus zyklischen Terpenen. Bei Verwendung des synthetischen Substrats (*Z,E*)-FPP (rechts) stieg der Anteil an zyklischen Terpenen an der Gesamtmenge von 47 % auf 96 % im Durchschnitt. Durch das synthetische Substrat wird der erste Reaktionsschritt der Isomerisierung umgangen, was zur sofortigen Ringbildung und damit zu dem hohen Anteil zyklischer Terpene führt.

Durch Inkubation mit dem synthetischen Substrat (*Z,E*)-FPP lag der Anteil der Aliphaten nur noch bei durchschnittlich 4,5 %. Zyklische Produkte wurden zu 95,5 % gebildet und von (*E*)- α -Bergamoten dominiert. Dabei blieb das charakteristische Verhältnis der zyklischen Sesquiterpene zueinander erhalten. Dieses Verhältnis der zyklischen Sesquiterpene zu α -Bergamoten beträgt ca. für β -Sesquiphellandren (6,5:1), β -Bisabolen (22:1), Zingiberen (25:1), Sesquisabinen A (37:1) und 7-*epi*-Sesquithujen (78:1).

Aufgrund der geringen Bildung von (*E*)- β -Farnesen bei Inkubation mit (*Z,E*)-FPP, kann man von einer eingeschränkten Rückreaktion nach Abspaltung des Diphosphats ausgehen. Die Rückreaktion bzw. die rückwärts gerichtete Isomerisierung vom cisoiden zum transoiden Farnesylcarbokation, also der Drehung um die Achse C_2-C_3 , fand kaum noch statt. Vom cisoiden Farnesylcarbokation ausgehend ist wahrscheinlich die Geschwindigkeitskonstante der 6,1-Zyklisierung zum Bisabolylycarbokation deutlich größer als die der rückwärtigen Isomerisierung zum transoiden Farnesylcarbokation. Zudem ist das Energiegefälle für die Zyklisierungsreaktion positiv und begünstigt damit die Ringbildung. Daher kann man bei Inkubation mit dem natürlich gebildeten (*E,E*)-FPP davon ausgehen, dass die Hin-Reaktion der Isomerisierung den geschwindigkeitsbestimmenden Abschnitt des Reaktionsmechanismus hinsichtlich der Bildung von zyklischen Sesquiterpenen darstellte. Diese konkurriert mit der Deprotonierung des transoiden Farnesylcarbokations zum (*E*)- β -Farnesen. Da die Anteile von zyklischen und nichtzyklischen Sesquiterpenen fast gleich sind, gehe ich von einer gleichen Reaktionsgeschwindigkeit für die Deprotonierung und der Isomerisierung aus.

Die Akzeptierung von (*E,Z*)-FPP und (*Z,Z*)-FPP als künstliche Substrate für TPS10 sollten ebenfalls getestet werden. Dies diene zur weiterführenden Untersuchung der Isomerisierungsreaktion und sollte ggf. weitere Möglichkeiten zur Isomerisierung an Position 6,7 zeigen. (*E,Z*)-FPP war leider im Rahmen meiner Arbeit nicht verfügbar. Ein Vergleich aufeinanderfolgender Inkubationen des selben Rohextrakts mit (*Z,Z*)-FPP (Sallaud, Rontein

3 Ergebnisse

et al. 2009) und (*E,E*)-FPP wurde in Abb.14 dargestellt. Für den Vergleich der Reaktionen wurden die Chromatogramme übereinandergelegt. Das Multiproduktenzym TPS10 zeigte seine hohe Toleranz bezüglich stereochemisch differenter Substrate durch Bildung von (*Z*)- β -Farnesen (A) als Hauptprodukt und (*E*)- α -Bergamoten (B magenta). (*E*)- β -Farnesen (C) wird wie gewohnt mit dem natürlichen Substrat gebildet. Auffällig ist die im Vergleich zur Reaktion mit (*E,E*)-FPP verringerte Bildung von zyklischen Terpenen. Dies liegt sehr wahrscheinlich am Abstand zwischen C₁ und C₆. Daher wäre eine Inkubation mit (*E,Z*)-FPP interessant und sollte zu einer verstärkten Bildung zyklischer Sesquiterpene in TPS10 führen.

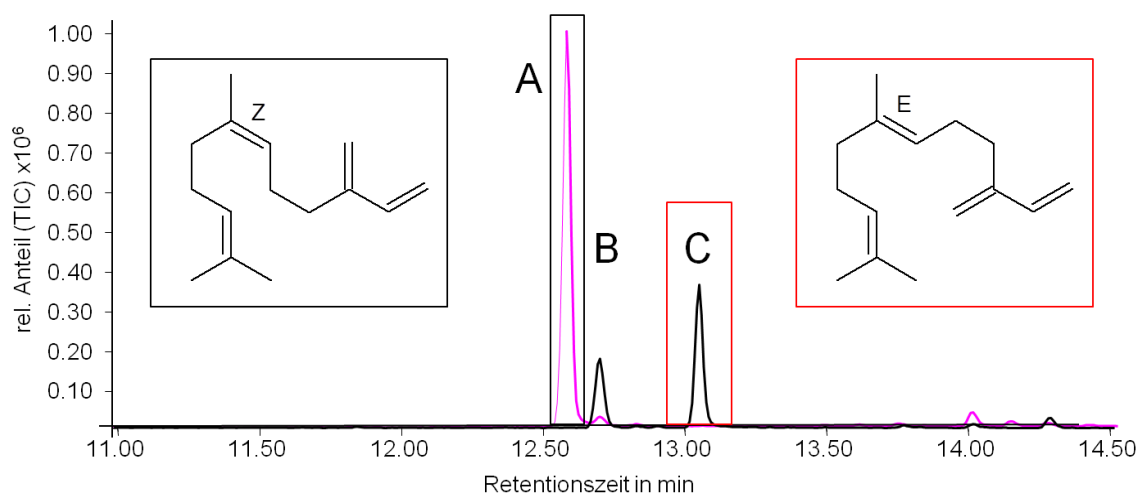


Abb. 14 Die Stereochemie des Substrats bestimmt die Produktbildung in TPS10

Der Vergleich der Sesquiterpenbildung bei der Inkubation mit stereochemisch unterschiedlichen Substraten (*E,E*)-FPP und (*Z,Z*)-FPP zeigte die Beibehaltung der durch das Substrat vorgegebenen Stereochemie C₆-C₇. Der selbe TPS10 Rohextrakt wurde mit den Substraten (*E,E*)-FPP und (*Z,Z*)-FPP separat inkubiert, die Chromatogramme aufeinanderfolgend aufgenommen und zur besseren Vergleichbarkeit übereinander gelegt. (*E,E*)-FPP (schwarzes Chromatogramm) zeigte (*E*)- α -Bergamoten und (*E*)- β -Farnesen als Hauptprodukte. (*Z,Z*)-FPP (magenta Chromatogramm) blieb in der vorgegebenen Ausrichtung und bildete (*Z*)- β -Farnesen aber auch (*E*)- α -Bergamoten. Im Gegensatz zur Verwendung von (*Z,E*)-FPP erfolgte im Vergleich zu (*E,E*)-FPP keine verstärkte Bildung von zyklischen Terpenen. Im Gegenteil wurde bei der Reaktion mit aus Tomate stammenden (*Z,Z*)-FPP mehr azyklisches (*Z*)- β -Farnesen gebildet. Die Konfiguration zwischen C₆-C₇ bleibt somit bei TPS10 in allen untersuchten Fällen erhalten und gibt die Bildung der Produkte vor.

Zur Untersuchung der Monoterpenaktivität wurde das Substrat Geranyldiphosphat (GPP) eingesetzt. Überraschenderweise war TPS10 in der Lage, dieses Substrat umzusetzen. Als Hauptprodukt wurde das aliphatische β -Myrcen (97 %) und als Nebenprodukt das zyklische α -Limonen (91 %) mit der Hilfe der Substanzbibliothek nach Adams identifiziert Abb.15. Daraufhin erfolgte die Identifizierung mit einem authentischen Standard von (*R*)-(+)-Limonen und (*S*)-(-)-Limonen. Da zur Bestimmung von β -Myrcen kein authentischer Standard vorlag wurden die charakterisierten Monoterpensynthasen TvTPS 6/ 7 (Krause et al.) aus Thymian verwendet, da diese neben Limonen auch β -Myrcen bilden. Die Inkubation mit GPP und die gaschromatographische Analyse des Terpenspektrums erfolgte bei TPS10, TvTPS 6/ 7 unter den gleichen Bedingungen. Die Retentionszeit des authentischen Standards und der MTPS aus *Thymus vulgaris* war dem identifizierten Limonenpeak in TPS10 identisch. Daher konnte die Retentionszeit von β -Myrcen aus den MTPS6 und 7 übertragen und damit identifiziert werden.

3 Ergebnisse

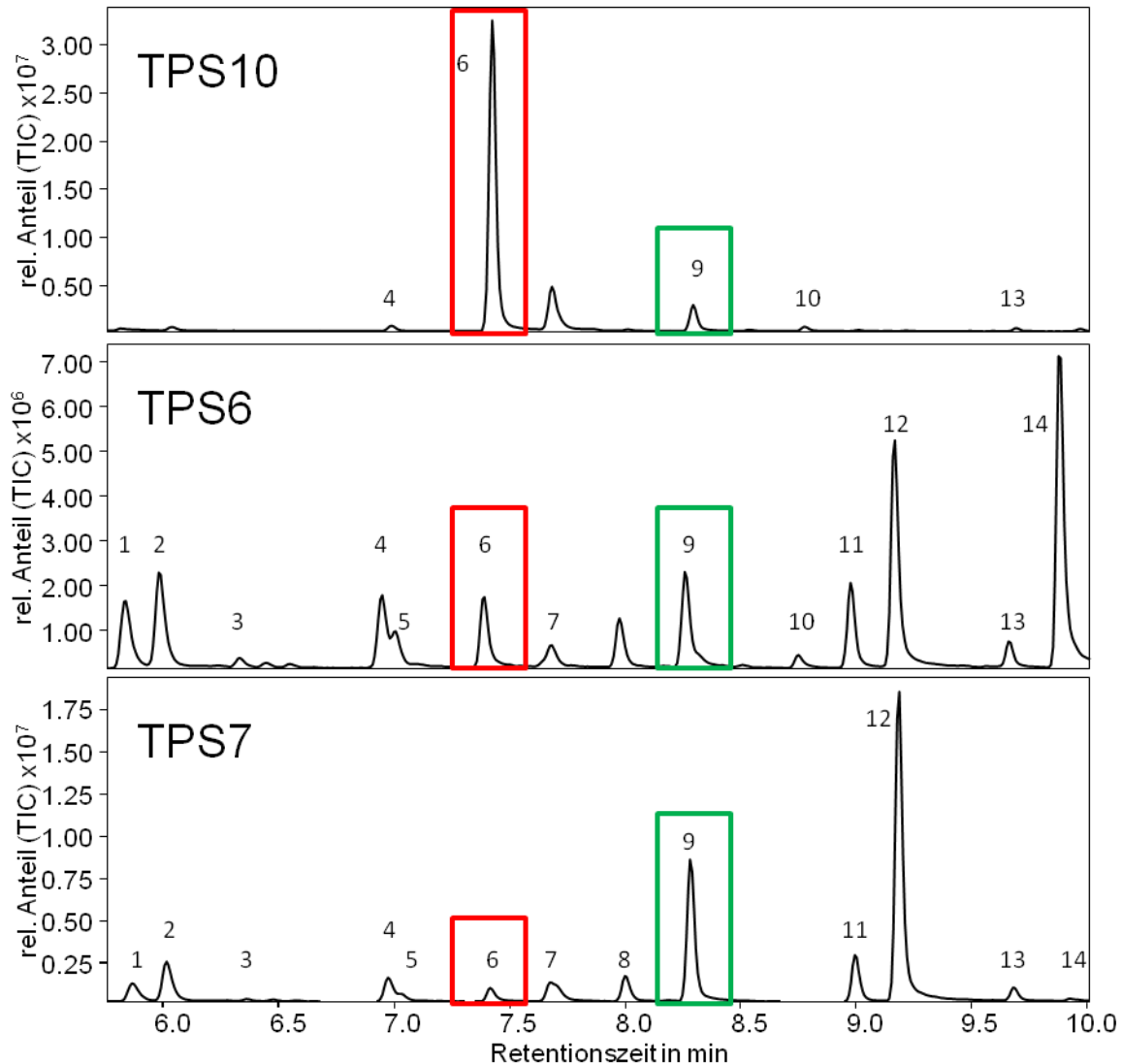


Abb. 15 Identifizierung der Monoterpenprodukte von TPS10

Zur Identifizierung der Monoterpene wurden neben Limonenstandards und Massenfragmentdatenbanken die Terpensynthesen 6 und 7 aus *T. vulgaris* eingesetzt und parallel zu TPS10 mit GPP 20 min inkubiert. Die Auswertung zeigte (1) α -Thujen, (2) α -Pinen, (3) Camphene, (4) Sabinen, (5) β -Pinen, (6) Myrcen, (7) α -Phellandren, (8) α -Terpinen, (9) Limonen, (10) (*E*)- β -Ocimen, (11) γ -Terpinen, (12) (*E*)-Sabinenhydrat, (13) Terpinolen und (14) (*Z*)-Sabinenhydrat. Für Myrcen lag kein Standard vor. Der Vergleich mit den Massenfragmenten der Datenbanken und den Retentionszeiten bei den vorliegenden Terpensynthesen aus Thymian zeigte das azyklische β -Myrcen als Hauptmonoterpen bei TPS10. Als Nebenprodukt konnte α -Limonen identifiziert werden.

3.1.1.2 Sammlung von Sesquiterpenen

Um den Reaktionsmechanismus von TPS10 im Detail zu untersuchen, sollte für die folgenden Versuche ermittelt werden, ob die Festphasenmikroextraktion (SPME) zur Analyse der Terpenprodukte genutzt werden kann. Dafür sollte dieses Verfahren mit der Hexanextraktion verglichen werden. Zu den Vorteilen der Flüssigextraktion mittels Hexan zählen die quantitative Bestimmung der Terpengemische, sowie die einfach zu realisierende Automatisierung der GC-Chromatographie. Ein Nachteil der Hexanextraktion ergibt sich bei der Analyse von Substanzen welche in geringen Mengen gebildet werden. Die Bestimmung kann durch die Vielzahl der Substanzen welche im Hexanextrakt vorhanden sind erschwert

3 Ergebnisse

sein. Volatile Substanzen sollen quantitativ in die lipophile Hexanphase übergehen. Diese wirkt aufgrund eines Mindestvolumens verdünnend auf die Konzentration an Sesquiterpenen. Im Fall der Analyse von volatilen Sesquiterpenkohlenwasserstoffen (STKW) eignet sich daher die Festphasenmikroextraktion. Diese adsorbiert nur die flüchtigen Substanzen, was zu starken Produktbanden führt und eine sehr gute Auswertung zulassen. Kritikpunkte dieser Methode betreffen das unterschiedliche Adsorptions- und Desorptionsverhalten verschiedener STKW und der damit verbundenen verringerten Sensitivität. Ebenfalls kann die Überladung der Extraktionsfaser bei großen Mengen an volatilen Stoffen zu Verdrängungseffekten führen. Dies vermindert die Sensitivität zusätzlich (Arthur and Pawliszyn 1990).

Ein Vergleich der beiden Extraktionsmethoden wurde jeweils mit einem partiell gereinigten TPS10-Proteinextrakt unter identischen Reaktionsbedingungen durchgeführt. Diese parallel inkubierten Proteinextrakte wurden nach 20 Minuten mit GC-MS analysiert (Abb.16). Die Menge der Sesquiterpenen im TIC-Chromatogramm nach der Hexanextraktion der Enzymassays war zehnfach geringer als bei der Festphasenmikroextraktion (SPME). Die Hexanextraktion der TPS10 Sesquiterpene wies erwartungsgemäß viele Nebensubstanzen auf, welche teilweise das Signal überlagerten. Bei der Extraktion mit Hexan kann nicht sichergestellt werden, dass alle Terpene in die Hexanphase übernommen werden und ob die Enzymaktivität bei Kontakt mit dem organischen Lösungsmittel verringert wurde. Dadurch ist die Sensitivität der GC-MS unzureichend und eine exakte Bestimmung der Terpenzusammensetzung unmöglich. Dies gilt insbesondere für Mutanten mit nur geringer Produktbildung und für die Analyse der Zusammensetzung der Nebenprodukte des Enzyms. Daher wurden weitere Untersuchungen mittels SPME-Methode realisiert. Das unterschiedliche Adsorptions- und Desorptionsverhalten von verschiedenen Verbindungen bei der Festphasenmikroextraktion lässt eine quantitative Aussage nur bedingt zu. Bei den TPS10 Produkten handelt es sich jedoch um eine homogene Gruppe von flüchtigen STKWs die in geringen Mengen gebildet werden. Diese haben ähnliche chemische Eigenschaften. Daher sollte die Darstellung der verschiedenen Anteile den realen Anteilen entsprechen, da geringe Terpenmengen im Assay die Verdrängungseffekte vernachlässigbar klein halten. Das lässt wiederum einen relativen Vergleich der Terpenbildung bei den verschiedenen Mutanten zu, auch weil alle Proben gleich analysiert wurden. Die größeren Mengen an Sesquiterpenen beim SPME-Extrakt erlaubt eine genauere Analyse der Nebenproduktzusammensetzung, die sogar in der *in vivo* Diagnostik verwendet wird (Lord et al.). Daher werden die oben genannten systematischen Fehler der Methode in Kauf genommen (Abb.16).

3 Ergebnisse

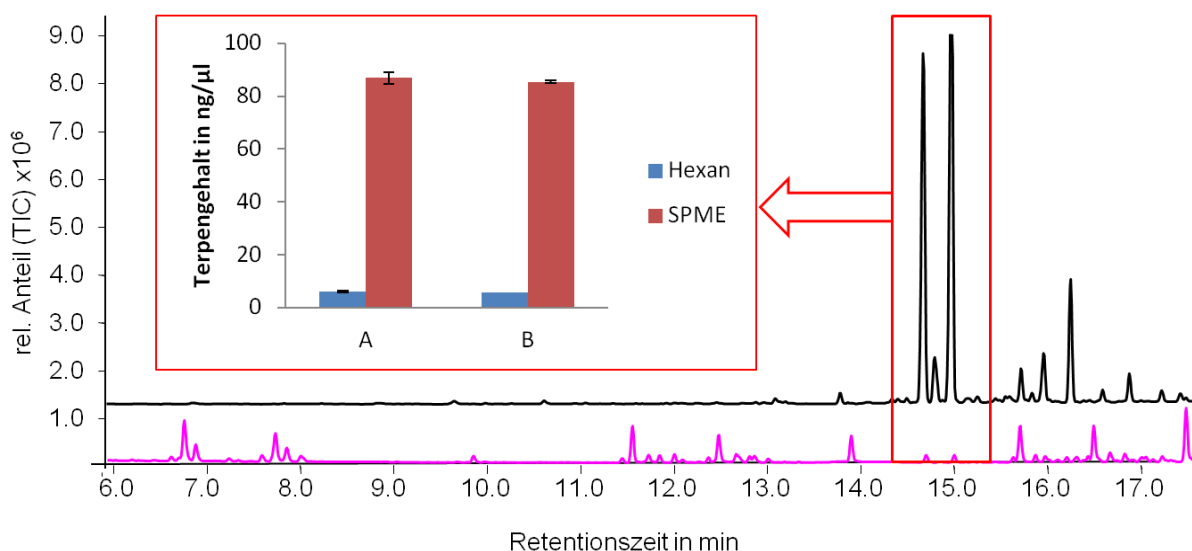


Abb. 16 Vergleich der Analysemethoden des Terpenspektrums von TPS10

Die Flüssigextraktion mit Hexan stellt eine geläufige Methode zur Extraktion von Kohlenwasserstoffen dar. Diese Methode ermöglicht eine quantitative Aussage über die Zusammensetzung der lipophilen Phase einer Enzym-Substrat-Reaktion. Diese allseitige Analyse birgt das Problem von Überlagerungen von Produktpeaks. Daher wurde mit der Festphasenmikroextraktion (SPME) eine selektivere Methode etabliert. Die Reaktion erfolgte mit beiden Methoden parallel über 20 min bei 30 °C mit (*E,E*)-FPP im Wasserbad. Die Extraktion der Terpene erfolgte laut Punkt 2.5.1 ff.. Die Abb.16 vergleicht die Chromatogramme der Hexanextraktion (magenta) und der Festphasenmikroextraktion (schwarz). Anhand einer Standardkurve erfolgte die Bestimmung der gebildeten Menge an A (*E*)- α -Bergamoten und B (*E*)- β -Farnesen. Diese wurden im Vergleich der Hexanextraktion und der Festphasenmikroextraktion dargestellt. Die Darstellungen des Gehalts beruhen in diesem Diagramm auf Mittelwerte. Die Standardabweichung wurde mit einer Probenzahl ($n=3$) dargestellt. Dabei zeigten sich deutlich geringere Mengen an Terpenen, was eine Analyse mit der Hexanextraktion erschwert.

3.1.1.3 Bestimmung der optimalen Reaktionstemperatur

Die Bildungsverhältnisse der Hauptprodukte (*E*)- α -Bergamoten und (*E*)- β -Farnesen zueinander ist zugunsten des azyklischen (*E*)- β -Farnesen verschoben (Schnee, Köllner et al. 2006). In der Summe stellen zyklische Sesquiterpene ungefähr die Hälfte aller Terpene im Wildtyp bei Inkubation mit (*E,E*)-FPP dar (s. Abb.13). Am Anfang der Datenakquise dieser Arbeit fielen geringe Unterschiede des Bildungsverhältnisses der Hauptprodukte zueinander auf. Der Anteil von (*E*)- α -Bergamoten war bei der Messung desselben partiell gereinigten TPS10-Proteinextrakts zeitweise höher als der von (*E*)- β -Farnesen. Dieser Effekt beruhte auf einer unzureichenden Temperaturkontrolle der Reaktionstemperatur.

Zu Beginn der Arbeit fand die Reaktion bei einer Raumtemperatur statt. Bedingt durch den jahreszeitlichen Temperaturwechsel schwankte auch die Raumtemperatur. Später fand die Reaktion bei konstanter Temperatur von 30 °C im Wasserbad statt. Der Aufbau dieser Apparatur ist dem Abschnitt 2.5.5 dieser Arbeit zu entnehmen. Die beobachteten Schwankungen im Bildungsverhältnis der Hauptprodukte korrelierten mit der Veränderung der Bedingungen. Daher sollte in weiteren Experimenten die Temperaturabhängigkeit der enzymatischen Reaktion bestimmt werden.

3 Ergebnisse

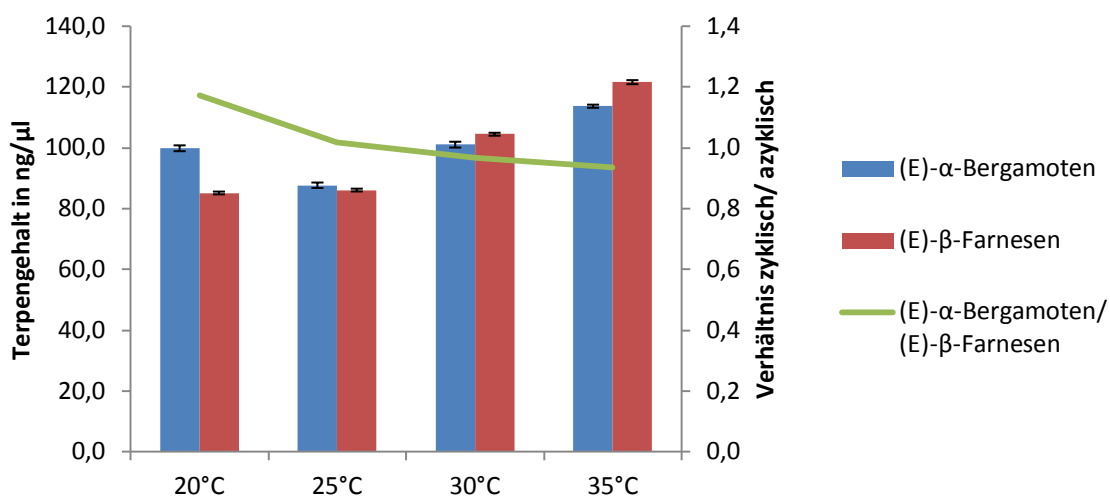


Abb. 17 Temperaturabhängigkeit der Bildung zyklischer Terpene von TPS10

TPS10 zeigt eine Abnahme der Menge zyklischer Terpene im Verhältnis zur Gesamtbildung bei einem Anstieg der Temperatur. Das Verhältnis der zyklischen und azyklischen Terpene wird auf der rechten y-Achse gezeigt. Diese werden vereinfacht durch das Verhältnis der Leiterterpene (*E*)-α-Bergamoten zu (*E*)-β-Farnesen dargestellt, da die Bildungsverhältnisse der Terpene innerhalb einer Mutante konstant blieben. Zur Visualisierung der Tendenz beim Anstieg der Temperatur, wurde die Darstellung des Bildungsverhältnisses im Diagramm als Linie gewählt. Weiterhin wurde die Bildung und Verteilung der TPS10 Hauptprodukte in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt (linke y-Achse). Derselbe TPS10-Proteinextrakt wurde am gleichen Tag, bei verschiedenen Temperaturen mit (*E,E*)-FPP, 20 min im Wasserbad inkubiert. Die Abbildung zeigt den Mittelwert des Proteingehalts ($n=3$) und den Standardfehler.

Es erfolgte die Reaktion desselben TPS10-Proteinextrakt aufeinanderfolgend bei verschiedenen Temperaturen (20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C) und wurde direkt im Anschluss der Reaktion vermessen (Abb. 17). Die Gesamtaktivität erhöhte sich mit steigender Temperatur und erreichte bei 35 °C ihr Maximum. Bei höheren Temperaturen ging die Bildung von Sesquiterpenen wieder zurück (hier nicht abgebildet). Interessanterweise konnte bei 20 °C der größte Anteil an zyklischen Produkten nachgewiesen werden. Diese werden in Abb. 17 durch (*E*)-α-Bergamoten repräsentiert. Das Liniendiagramm in Abb.17 zeigt die Summe aller zyklischen Terpene im Verhältnis zu den azyklischen Terpenen. Bei 20 °C erreichte dieses Verhältnis sein Maximum von 1,2, d.h. es wurden ca. 20 % mehr zyklische als azyklische Terpene gebildet. Bei einer Temperatur von 25 °C wurden gleiche Mengen an zyklischen und azyklischen Terpenen gebildet. Durch die Erhöhung der Temperatur wurden bei 30 °C und 35 °C mehr azyklische als zyklische Terpene gebildet und entspricht der Publikation von Schnee (Schnee, Köllner et al. 2006). Es ist nicht auszuschließen, dass bei einer Temperaturverringerung mehr zyklische Terpene gebildet werden. Dies würde aber wahrscheinlich zur Reduzierung der Gesamtterpenbildung führen. Ein Einfluss der Temperatur auf die Isomerisierungsreaktion vom (*E,E*)-FPP zum cisoiden Farnesylcarbokation, als Grundlage zur Bildung zyklischer Terpene, ist ersichtlich und erklärt die anfänglichen Schwankungen der Ergebnisse.

3.1.1.4 Wahl des Vektorsystems für die Proteinexpression

Für die Aufreinigung besteht die Möglichkeit der N-terminalen und C-terminalen Markierung. Um den Einfluss der Markierung auf die Enzymaktivität zu testen, wurden zwei Vektoren mit

3 Ergebnisse

unterschiedlicher Position der Markierungen ausgewählt. Der Vektor pASK-IBA37⁺ (A) besaß eine Markierung am N-terminalen Ende, pASK-IBA33⁺ (B) am C-terminalen Ende. Die Kombination beider Vektoren stellte ein ideales System zum Vergleich der Enzymaktivität bei unterschiedlicher Lage der Markierung dar.

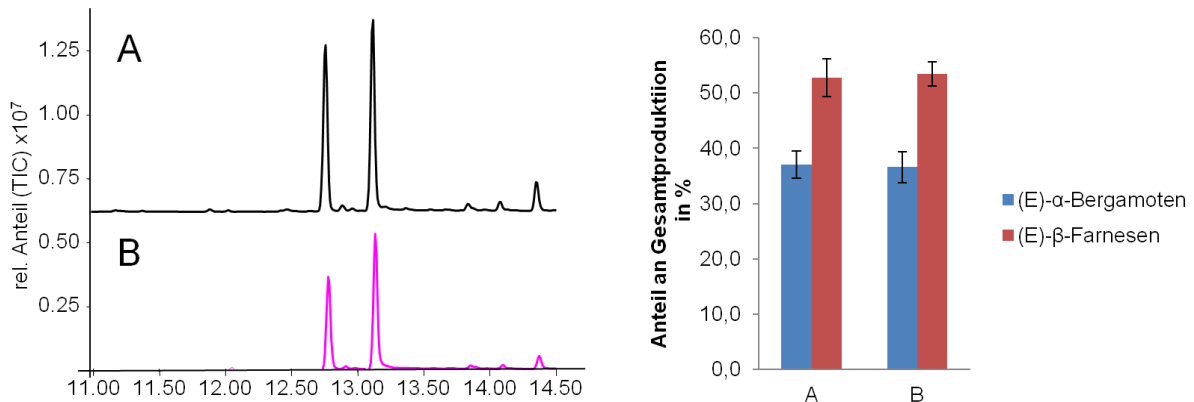


Abb. 18 Einfluss der Position des 6xHistidin-Tags auf die Terpenbildung von TPS10

Die Position des Histidin-Anhangs kann die Terpenbildung des Enzyms beeinflussen. Für die Arbeit war es erforderlich zwei Vektoren zu verwenden die sich nur in der Lage ihrer Histidin-Markierung unterschieden. Daher wurde TPS10 in diese beiden Vektorsysteme kloniert und identisch inkubiert. Die Chromatogramme links zeigen die Festphasenmikroextraktion von TPS10 der Maisinzuchtlinie B73 in (A) pASK-IBA37⁺ und (B) pASK-IBA33⁺. Das Diagramm rechts zeigt den Anteil der TPS10 Hauptprodukte an der Gesamtproduktion. Es wurden verschiedene Rohextrakte (n=3).

Aus den Ergebnissen in Abb. 18 geht kein signifikanter Unterschied aus der Lage der 6x Histidin-Markierung in Bezug auf die Terpenbildung von TPS10 hervor. Somit zeigte die Position der Histidin-Markierung am Protein keine Auswirkungen auf die Aktivität und beide Vektoren konnten parallel verwendet werden. Dies vereinfachte die Durchführung von N-terminalen und C-terminalen Trunkierungen siehe Kapitel 3.2.1 Strukturelle Untersuchung der N- und C-terminalen Enden (Trunkierungsexperimente).

3.1.2 Computergestützte Proteinanalyse

In Anlehnung an die Klassifikation der Terpensynthasen durch (Trapp and Croteau 2001) konnte TPS10 in die Gruppe 3 eingeteilt werden. Diese besteht aus sieben Exons (E1 - 75bp, E2 - 259bp, E3 - 367bp, E4 - 219bp, E5 - 136bp, E6 - 252bp, E7 - 294bp). Die Metallbindemotive liegen danach auf Exon 4 (DDxxD-Motiv) und Exon 6 (NSE-Motiv) (Abb. 19).

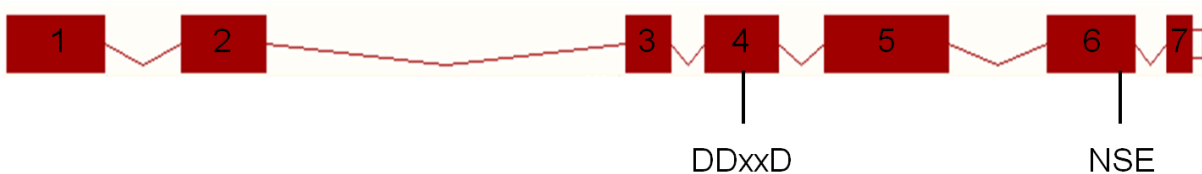


Abb. 19 Die Exon-/ Intronstruktur von tps10

Die Exon-/ Intronstruktur wurde mit <http://www.gramene.org/> erstellt und diente der Einordnung von tps10 in die große Familie der Sesquiterpensynthasen (STPS). Bei dem Gen tps10 handelt es sich um eine Klasse 3

3 Ergebnisse

Sesquiterpensynthase nach der Klassifizierung von (Trapp and Croteau 2001). Die Klasse 3 STPS bestehen aus 7 Exons und kodieren für zwei Metallbindemotive. Das DDxxD-Motiv wird von Exon 4 und das NSE-Motiv von Exon 6 kodiert.

Das Molekulargewicht von TPS10 (Accession no. AAX99146) wurde mit 61,5 kDa berechnet. Das entspricht dem Molekulargewicht anderer Sesquiterpensynthasen wie der 5-*epi*-Aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* mit 63,3 kDa (Facchini and Chappell 1992) und der TPS1 aus Mais mit 67,3 kDa (Schnee, Köllner et al. 2002). Die 5-*epi*-Aristolochensynthase wurde bereits kristallisiert (Starks, Back et al. 1997) und stellt seit dem die Grundlage zur Betrachtung der Sesquiterpensynthasen im Homologiemodell. Eine weitere Kristallstruktur einer Sesquiterpensynthase stellt die (+)-delta-Cadinene Synthase aus *Gossypium arboreum* dar (Gennadios, Gonzalez et al. 2009). Die 3-dimensionale Struktur und Proteingröße (64,15 kDa) ähnelt der 5-*epi*-Aristolochensynthase. Somit ging ich von einer vergleichbaren 3-dimensionalen Struktur bei TPS10 aus.

3.1.2.1 Allgemeine Methoden und Multisequenzvergleich

Mais ist ein Pflanzensystem wo das Genom bereits sequenziert wurde. Daher konnte bei Anfertigung der Arbeit auf zahlreiche Datenbanken zur Recherche zurückgegriffen werden. Zur Bestimmung der Sequenzen und Strukturen der Terpensynthase TPS10 wurden die Daten vom „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI) und der „RCSB PDB“ genutzt.

Ziel war es TPS10 der Maisinzuchtlinie B73 mit anderen bereits veröffentlichten Sesquiterpensynthasen zu vergleichen. Dabei sollten, außer dem für Terpensynthasen obligatorischen RxR-Motiv und dem DDXXD-Motiv, weitere konservierte Bereiche in der Aminosäuresequenz identifiziert werden. Diese stellen potentiell wichtige Schaltstellen für den Reaktionsmechanismus bei TPS10 dar. Diese Analyse wurde durch globale Alignments von 110 bis 2009 veröffentlichten Sesquiterpensynthasen mit dem Programm MultAlin (Corpet 1988) realisiert (Anhang Tab. I). Von besonderem Interesse war für mich ein Vergleich im Bereich der Metallbindemotive $_{286}\text{DDXXD}_{290}$ und $_{430}\text{NSE}_{438}$ aus B73-TPS10 mit Sesquiterpensynthasen aus anderen Pflanzen. Diese liegen wie bei allen Sesquiterpensynthasen der Gruppe 3 auf Exon IV und VI. Durch den Vergleich sollten Besonderheiten der Metallbindemotive identifiziert werden. Interessant waren dabei die Erscheinungsform und die Häufigkeit der verschiedenen Formen der Metallbindemotive. Das Interesse erklärt sich aus der Wichtigkeit der Metallbindemotive für den Reaktionsmechanismus. Sie liegen am Eingang zum aktiven Zentrum und dienen laut (Starks, Back et al. 1997) der Abspaltung des Diphosphats vom Substrat. Die Tabelle (Anhang Tab. I) zeigt einen Ausschnitt des Multisequenzvergleichs nach der Superpositionierung mithilfe des Clustal W-Algorithmus (Thompson, Higgins et al. 1994).

Im Vergleich der Aminosäuresequenzen fällt das N-terminale DDXXD-Motiv auf, welches hoch konserviert mit nur einer Ausnahme bei allen publizierten Sesquiterpensynthasen vorkommt. Das zweite C-terminale Metallionenbindemotiv auf Exon VI unterlag einer größeren Variabilität. Aufgrund der Art der C-terminalen Metallbindemotive habe ich die Terpensynthasen in vier Gruppen eingeteilt. Gruppe 1 hatte, neben dem ubiquitär vorkommenden DDxxD-Motiv auf Exon IV, ein zweites DDXXD-Motiv (DDXXD, DDXXE), Gruppe 2 ein NSE-Motiv (NSE, NGE, NTE) und Gruppe 3 bildete ein DSE-Motiv (DSE, DGE, DTE) aus. Gruppe 4 benötigte für seine Funktion kein zweites Metallbindemotiv (Abb. 20).

3 Ergebnisse

Die Angaben in Klammern zeigen die Variabilität der einzelnen Motive in sich. Somit gehört TPS10 (Accession no.: AAX99146) in die Gruppe 3.

Laut Statistik umfasste Gruppe 3 (Abb. 20) die meisten pflanzlichen Sesquiterpensynthesen (Vedula et al. 2008). Gruppe 2 stellt vor allem Sesquiterpensynthesen aus Poaceae wie *Oryza sativa* (Cheng et al. 2007; Yuan et al. 2008), *Zea mays* (Schnee, Köllner et al. 2002; Köllner, Schnee et al. 2004) und *Teosinte*-Varianten (Köllner et al. 2008), welche bereits biochemisch charakterisiert wurden. Eine Zuordnung bestimmter Pflanzenfamilien zu den einzelnen Gruppen konnte nicht getroffen werden. Eine Ausnahme bildete die Familie der Poaceae, die ausschließlich der Gruppe 2 angehörte. Eine Einteilung der Stammpflanzen zu den jeweiligen Gruppen war auch nicht möglich, da z.B. *Zea mays* und *Teosinte*-Arten vollständig der Gruppe 2 angehörten, wobei andere gut dokumentierte Pflanzen wie *Artemisia annua* STPS der Gruppen 2 und 3 bildeten. Es ließ sich auch keine Korrelation zwischen Gruppenzugehörigkeit und Produktbildung herleiten. Weiterführende Ergebnisse zu den Metallbindemotiven wurden im Kapitel 3.2.2.1 dargestellt.

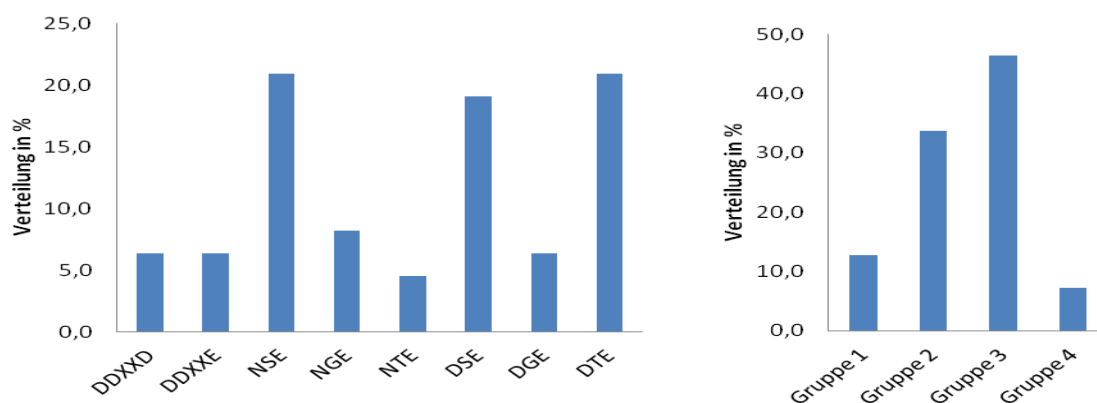


Abb. 20 Klassifikation der Varianten des C-terminalen Metallionenbindemotivs bei publizierten pflanzlichen Sesquiterpensynthesen

Das C-terminale Metallbindemotiv auf α -Helix H (Starks, Back et al. 1997) zeigt eine Vielzahl von möglichen Erscheinungsformen. Eine Analyse der bis 2009 publizierten Sesquiterpensynthesen (STPS) zeigt im linken Diagramm die prozentuale Verteilung der Motivvarianten in diesen Sesquiterpensynthesen. Daneben existiert bei allen untersuchten STPS ein DDxxD-Motiv auf α -Helix D. Das rechte Diagramm zeigt eine Klassifikation nach unterschiedlichen Gruppen und deren prozentuale Verteilung bezogen auf die Gesamtanzahl der untersuchten STPS. Das Diagramm gibt damit eine Übersicht über die Verteilung der Metallbindemotive im Pflanzenreich. Eine eindeutige Präferenz für DTE-Varianten in pflanzlichen Terpensynthesen (Vedula, Jiang et al. 2008) konnte nicht festgestellt werden.

3.1.2.2 Modelling und Modellverfeinerung

Eine räumliche Struktur von TPS10 wurde mithilfe der bereits bekannten Struktur der 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS) aus *Nicotiana tabacum* erstellt (Starks, Back et al. 1997). Diese Terpensynthase zeigt hinsichtlich Funktion und Sequenzähnlichkeit (35 % auf Aminosäureebene) die größte Übereinstimmung zu TPS10. Das Programm Swiss Model (Guex and Peitsch 1997) wurde zur Erstellung eines Homologiemodells von TPS10 genutzt. BLAST, Alignment und Verfeinerung des Modells wurden bei Swiss Model internetbasiert in automatischen Prozessen durchlaufen. Dies führte jedoch nicht immer zu zufriedenstellenden Ergebnissen. Zum Beispiel trat in der Berechnung eine Verkürzung des N-terminalen Endes ein, da dieses nicht eindeutig zugeordnet werden konnte. Weiterhin wurden orbitale Wechselwirkungen in TPS10 nicht optimal berechnet, was zu Fehlern in der

3 Ergebnisse

Darstellung führte. Leider fehlten Strukturen, die das Enzym TPS10 mit und ohne Substratinteraktion zeigt, um sich daraus ergebene Konformationsänderungen zu betrachten.

Dieses Modell weiter zu optimieren war die Aufgabe einer Diplomandin des Leibniz Instituts der AG W. Brandt. Ziel war es mit Hilfe dieser Methode einen besseren Einblick in die Funktionsweise des Proteins zu erlangen. Der Fokus lag zunächst auf den Metallbindemotiven am Eingang zum aktiven Zentrum. Weiterführend wurde im hydrophoben Bereich innerhalb des aktiven Zentrums geschaut, welche Aminosäuren an der Stabilisierung von Intermediaten der Reaktion beteiligt waren (s. Kap. 3.2.3). Außerdem sollten Reaktionsmechanismen untersucht und genauere Berechnungen von energetischen Prozessen durchgeführt werden. Das optimierte Modell (Abb. 21) stellte dafür die Grundlage für Dockingstudien und Berechnungen der Standard-Bildungsenthalpie und –Reaktionsenthalpie einzelner Intermediate und Produkte dar (Szczyzny 2011).

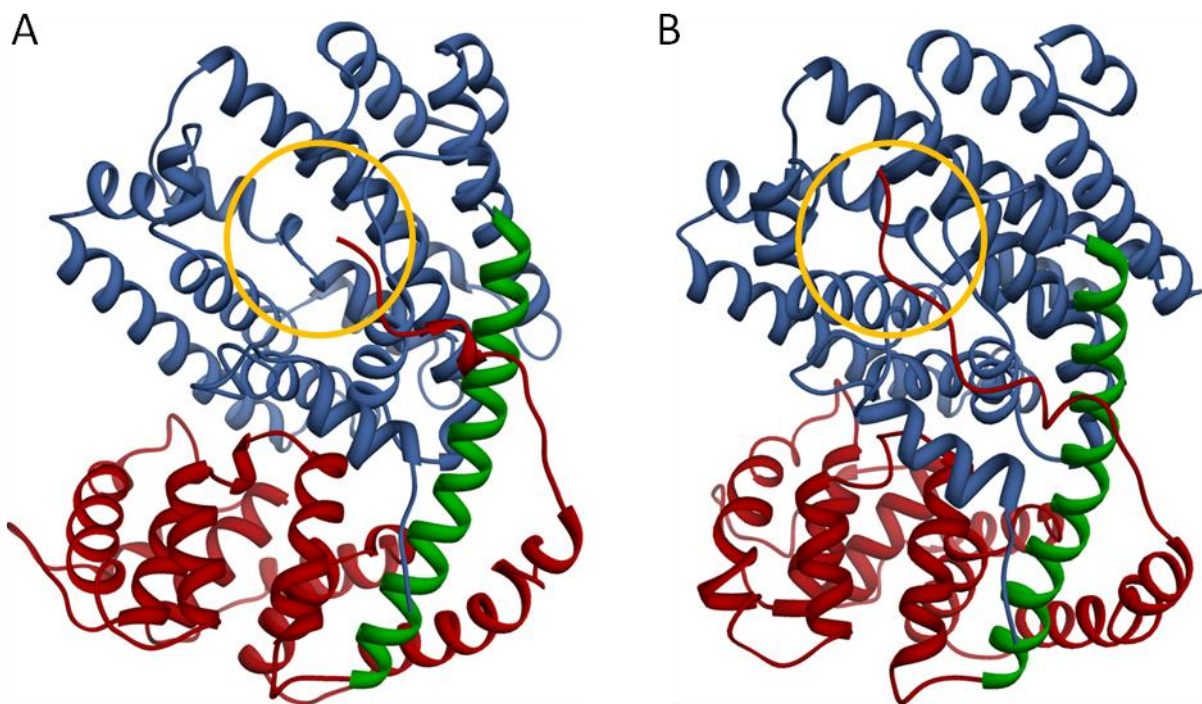


Abb. 21 Gegenüberstellung der Homologiemodelle vor und nach der Modellverfeinerung

Die Erzeugung von aussagekräftigen Homologiemodellen erfolgt häufig mit sehr viel Aufwand. Daher werden automatisch erzeugte Modelle zur Erklärung von Reaktionsmechanismen herangezogen. Bei TPS10 konnte der N-terminale Bereich nicht vollständig dargestellt werden und wurde daher manuell optimiert. (A) zeigt das TPS10 Homologiemodell von SwissModel. Die N-terminale Domäne (rot) wurde am 5'-Ende verkürzt dargestellt. Die C-terminale Domäne (blau) mit dem aktiven Zentrum (orange) wurde korrekt dargestellt. Helix A (grün) zeigt den Übergang zwischen beiden Domänen. Nach der Optimierung (B) durch die AG W. Brandt konnte der N-Terminus besser dargestellt werden.

3.1.2.3 Berechnungen zur Standardbildungsenthalpie bei TPS 10

Durch die Berechnung der Standardbildungsenthalpie aller Intermediate und Produkte in TPS10, konnte die Standardreaktionsenthalpie ($\Delta_R H$) für jede Reaktion, laut Hess'schem Wärmesatz, durch Subtraktion der Bildungsenthalpie bestimmt werden (siehe Punkt 2.5.8.2). Ausgehend vom TPS10 Reaktionsmechanismus (Köllner, Gershenzon et al. 2009) erfolgte

3 Ergebnisse

zunächst die $\Delta_R H$ -Bestimmung von der Diphosphatabspaltung der Edukte (*E,E*)-FPP und (*Z,E*)-FPP. Beide Substrate waren zur Betrachtung der Isomerisierungsreaktion wichtig, welche den Ausgangspunkt für die Bildung von zyklischen Produkten darstellt. Für die Abspaltung des Diphosphats vom Substrat spielten das Doppelargininmotiv (RxR) und weitere Arginine eine wichtige Rolle. Die Arginine als reaktive Guanidiniumionen ($\Delta_B H = 156,4$ kcal/mol) spalten das stabilere FPP ($\Delta_B H = -482$ kcal/mol). Das Guanidiniumion reagiert dabei zum stabileren Guanidin ($\Delta_B H = 13,9$ kcal/mol) so dass ein reaktives Farnesylcarbokation ($\Delta_B H = 182,4$ kcal/mol) und ein stabiles Diphosphat ($\Delta_B H = -485$ kcal/mol) gebildet wurden. Die Berechnung Reaktionsenthalpie $\Delta_R H$ der Diphosphatabspaltung ergab für (*E,E*)-FPP 38,6 kcal/mol und (*Z,E*)-FPP 36,6 kcal/mol. Der Unterschied der $\Delta_R H$ betrug lediglich 2 kcal/mol zwischen den Substraten. Somit waren beide Reaktionen als leicht endotherm und energetisch gleichwertig anzusehen (Abb. 22).

Der postulierte Reaktionsmechanismus (Köllner, Gershenzon et al. 2009) beinhaltet eine Drehung um die Achse von C_2-C_3 nach Abspaltung der Diphosphat-Gruppe, wie sie bei einigen Terpensynthesen dargestellt wird (Williams et al. 1998; Little and Croteau 2002). Diese Drehung ist aufgrund einer delokalisierten Ladung nicht möglich. Daher erfolgt eine Rephosphatierung an C_3 , wodurch die Drehung ermöglicht wird und aus einem transoiden, ein cisoides Nerolidyldiphosphat wird. Als letzten Reaktionsschritt dieser Isomerisierung wird das Diphosphat erneut abgespalten. Dieser Reaktionsmechanismus wurde als Grundlage für die energetischen Berechnungen am TPS10 Modell verwendet (Szczyzny 2011). Sie stellte einige Probleme dar, welche in der Diskussion im Kapitel 4.1 dargestellt sind. Den Anfang machte eine Rephosphatierung ($\Delta_R H = -458,4$ kcal/mol) an Position C_3 . Somit würde aus dem (*E,E*)-Farnesylcarbokation ($\Delta_B H = -182,9$ kcal/mol) ein transoides Nerolidyldiphosphat ($\Delta_B H = -275,5$ kcal/mol) gebildet, welches zur Rotation ($\Delta_R H = 2,2$ kcal/mol) um C_2-C_3 befähigt wäre. Dadurch würde das cisoides Isomer des Nerolidyldiphosphats ($\Delta_B H = 273,3$ kcal/mol) entstehen, welches durch erneute Abspaltung der Diphosphatgruppe ($\Delta_R H = 455,7$ kcal/mol) zum 2-*cis*-6-*trans*-Farnesylcarbokation ($\Delta_B H = -182,4$ kcal/mol) reagiert. Letzteres stellte die Konformation dar, welche durch elektrophilen Angriff von C_1 zu C_6 zur thermodynamisch begünstigten Zyklisierung ($\Delta_R H = -15,7$ kcal/mol) führte. Der Ringschluss zum reaktiven (*S*)-Bisbolylycarbokation ($\Delta_B H = 166,7$ kcal/mol) bildete den Ausgangspunkt zu vielen weiteren Reaktionsmöglichkeiten des Multiproduktenzyms und ermöglichte somit die Vielfalt der zyklischen Terpene in TPS10. Die Berechnungen wurden immer für alle theoretisch möglichen Stereoisomere durchgeführt. Der folgende Text bezieht sich immer auf das stabilste Stereoisomer.

3 Ergebnisse

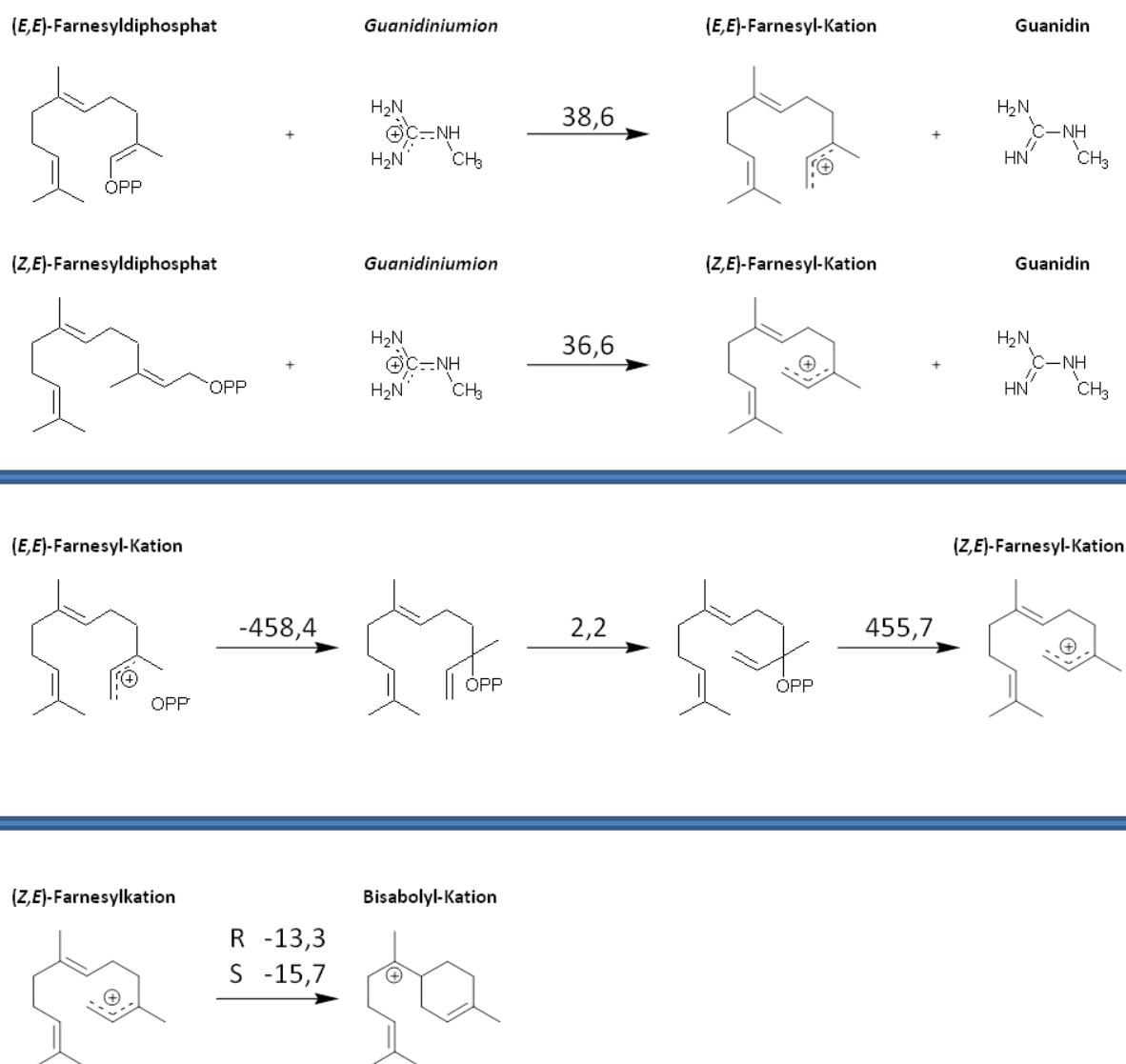


Abb. 22 Überblick der Zwischenreaktionen in TPS10

Abspaltung der Diphosphatgruppe im Vergleich von (E,E)-FPP und (Z,E)-FPP, gefolgt von der Isomerisierungskaskade und der Zyklisierung, sind mit ihrer berechneten Standardreaktionsenthalpie ($\Delta_R H$) als Zahl auf dem Reaktionspfeil dargestellt. Die Angabe der $\Delta_R H$ erfolgte in kcal/mol. Negative Vorzeichen stehen für eine exotherme Reaktion. Endothermie wurde ohne Vorzeichen dargestellt.

Die Abbildung 23 zeigt die Bildung der Endprodukte. Diese lassen sich in azyklische, monozyklische und bityklische Aliphaten unterteilen. Das am leichtesten zugängliche ist das azyklische (E)- β -Farnesen. Durch einfache Deprotonierung aus dem (E,E)-Farnesylcarbocation wurde dieses TPS10 Hauptprodukt gebildet, d.h. es wurden keine weiteren Umlagerungen, Ringschlüsse etc. durchlaufen. Die Deprotonierung ($\Delta_R H = -149,8$ kcal/mol) ist eine stark exotherme Reaktion. Als Protonenakzeptor fungierte, wie bei allen anderen Deprotonierungen, das Aspartat D510.

Die monozyklischen Produkte Abb. 23 (6S)- β -Bisabolen ($\Delta_B H = -7,6$ kcal/mol), (6R,7S)- β -Sesquiphellandren ($\Delta_B H = -2,8$ kcal/mol) und (6R,7S)-Zingiberen ($\Delta_B H = -5,3$ kcal/mol) entstehen alle aus dem Bisabolycarbocation. Bei Bisabolen geschieht dies durch direkte

3 Ergebnisse

Deprotonierung des Carbokations. Bei den anderen Monozyklen erfolgte vor der Deprotonierung eine Hydrid-Umlagerung im Bisabolylcarbokation. Bei Zingiberen geschah dies schwach endotherm von C₇ zu C₄ und bei β-Sesquiphellandren schwach exotherm von C₇ zu C₃. Das reale Bildungsverhältnis der Produkte β-Sesquiphellandren : β-Bisabolen : Zingiberen beträgt 10:5:1. Dies lässt sich aus den Δ_RH nicht ableiten. Es wäre zu erwarten gewesen, dass β-Bisabolen am häufigsten gebildet wird. Es stellt das stabilere und leichter zugängliche Molekül dar.

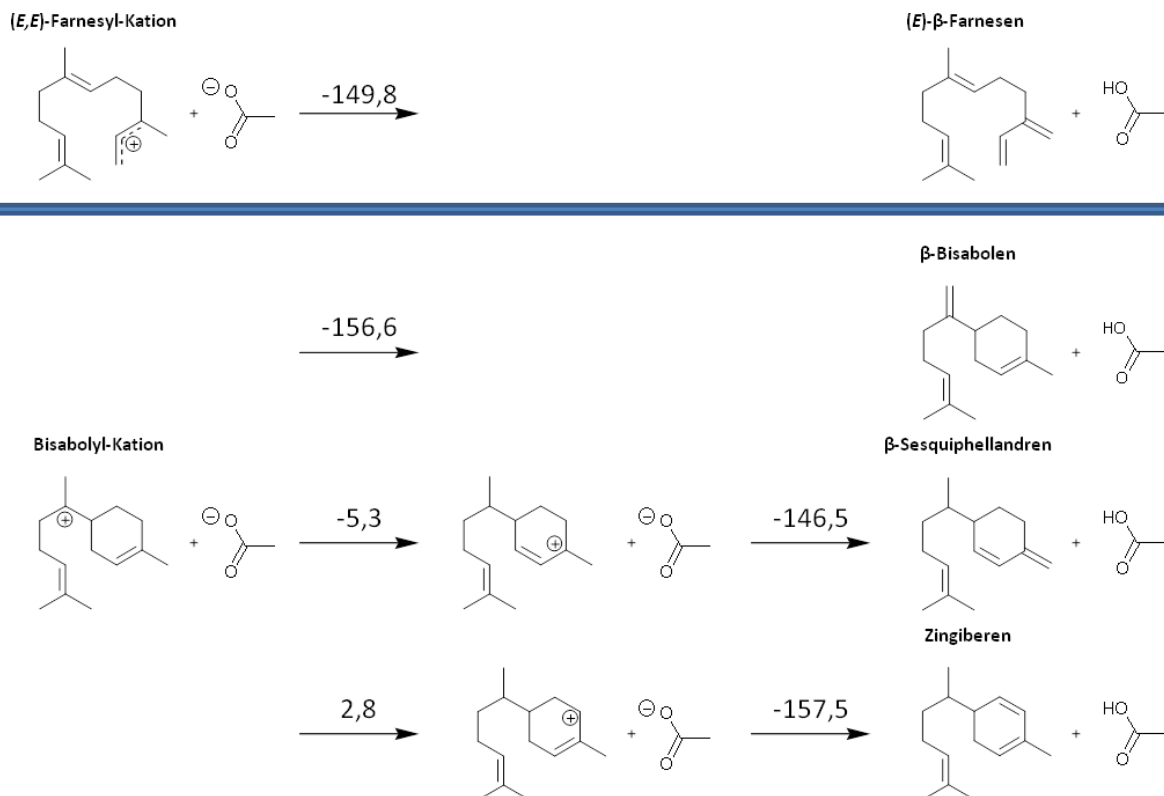


Abb. 23 Produktbildung der azyklischen und monozyklischen Terpene in TPS10

Die Standardreaktionsenthalpie (Δ_RH) wurde als Zahl auf dem Reaktionspfeil in der Angabe kcal/mol dargestellt. Endotherme Reaktionen sind ohne Spezifikator, exotherme Reaktionen mit einem negativen Vorzeichen gezeit.

Die Entstehung der bicyklischen Terpene wurde in Abb. 24 zusammengefasst dargestellt. Die Reaktionen sind durch eine zweite Ringschlussreaktion gekennzeichnet. Bei der Bildung von (2S,6S,7R)-(E)-α-Bergamoten (Δ_BH=3,9 kcal/mol) geschieht dies direkt mit einem endothermen elektrophilen Angriff von C₇ nach C₂ unter Bildung eines Zylobutanrings. Durch die Spannung ist die Standardbildungsenthalpie größer als bei den Monozyklen.

Bei der Reaktion zu den beiden anderen Bicyklen 7-*epi*-Sesquithujen (Δ_BH=8,3 kcal/mol) und Sesquisabinen A (Δ_BH=8,7 kcal/mol) findet vor dem zweiten Ringschluss eine Hydrid-Umlagerung von C₇ zu C₆ statt. Danach erfolgt unter Bildung eines Zylopropanrings, die elektrophile Zyklisierung von C₆ nach C₂. Die Entstehung dieser Bicyklen in TPS10 ist sehr gering.

3 Ergebnisse

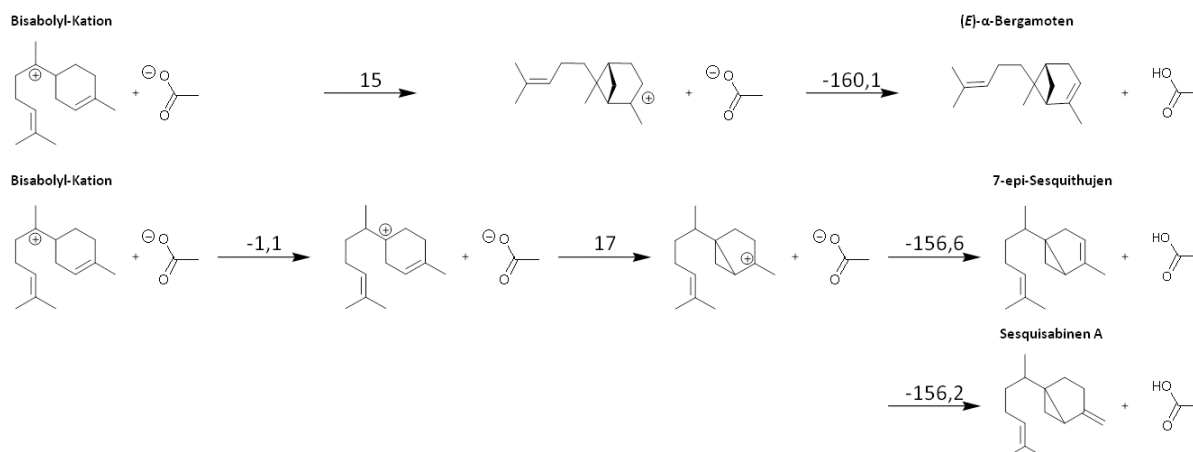


Abb. 24 Bizyklen – Hauptprodukt und Randprodukte

Die Standardreaktionsenthalpie ($\Delta_R H$) wurde als Zahl auf dem Reaktionspfeil in der Angabe kcal/mol dargestellt. Endotherme Reaktionen wurden ohne Spezifikator, exotherme Reaktionen mit einem negativen Vorzeichen dargestellt.

Diese Ergebnisse zeigen, dass alle Deprotonierungen exotherme Reaktionen sind, die somit thermodynamisch begünstigt werden und zu stabileren Produkten führen. Die Zwischenschritte, Zyklisierungen und Hydrid-Umlagerungen, sind teilweise endotherm, benötigen also geringe Energiemengen. Diese sind jedoch kleiner als die Energie für die Startreaktion. Die Stabilität der Bizyklen ist, aufgrund der gespannten Zykllobutan- bzw. Zyklopropanringe, etwas reduziert.

3.2 Struktur-Funktionsanalyse

Das Homologiemodell der Terpensynthese 10 bietet eine Möglichkeit strukturelle Bewertungen von Enzym-Substrat-Interaktionen vorzunehmen und bisher unbekannte Wechselwirkungen zu erkennen. Ausgehend von der 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS) wurde ein Modell für TPS10 entwickelt, da TEAS hinsichtlich Aminosäuresequenz und Funktion die größte Übereinstimmung mit TPS10 zeigt (Starks, Back et al. 1997). Das Modell besteht aus zwei Domänen die über eine charakteristische α -Helix A (Starks, Back et al. 1997) miteinander verbunden sind. An dieser α -Helix orientiert sich die Faltung der C-terminale Domäne, wo das aktive Zentrum von TPS10 und allen ionisationsabhängigen Sesquiterpensynthasen lokalisiert ist. Aus TEAS konnten Bereiche der N- und C-terminalen Domäne identifiziert werden, welchen einen ungeordneten Zustand bei Abwesenheit des Substrats einnehmen und sich bei Substratbindung an Helix A ausrichten (Zerbe et al. ; Starks, Back et al. 1997; Peters et al. 2003). Diese sind die Schleifenregionen zwischen dem N-terminalen Ende, Helix A-C und Helix J-K. Bei der Ausrichtung nach erfolgter Substratbindung bilden die A-C-Schleife und das variable Ende des N-terminalen Endes eine Bindungstasche für das Diphosphat, die Konformationsänderung J-K-Schleife führt zur Abschirmung des aktiven Zentrums vom Lösungsmittel (Starks, Back et al. 1997). Trunkierungsexperimente an der Abietadiensynthase, einer Diterpensynthase aus *Abies grandis* (Peters, Carter et al. 2003), führten zur Annahme die N-terminalen Domäne könnte als Faltungshelfer fungieren. In diesem Zusammenhang durchgeführte Trunkierungen am C-terminalen Ende zeigten zusätzlichen einen Aktivitätsverlust.

3 Ergebnisse

Das Homologiemodell von TPS10 zeigt, dass die α -Helix A sowohl vom N-terminalen Ende, als auch vom C-terminalen Ende flankiert wird. Im Detail erkennt man die räumliche Nähe von aromatischen Aminosäuren wie Phenylalanin und Tryptophan zueinander (Abb. 25). Die daraus resultierenden π - π -Wechselwirkungen tragen wahrscheinlich zur Stabilität und damit zur Funktionalität des Enzyms bei. Mit Trunkierungsstudien an TPS10 sollte versucht werden bisherige Erkenntnisse auf eine Sesquiterpensynthase zu übertragen und erweitert werden.

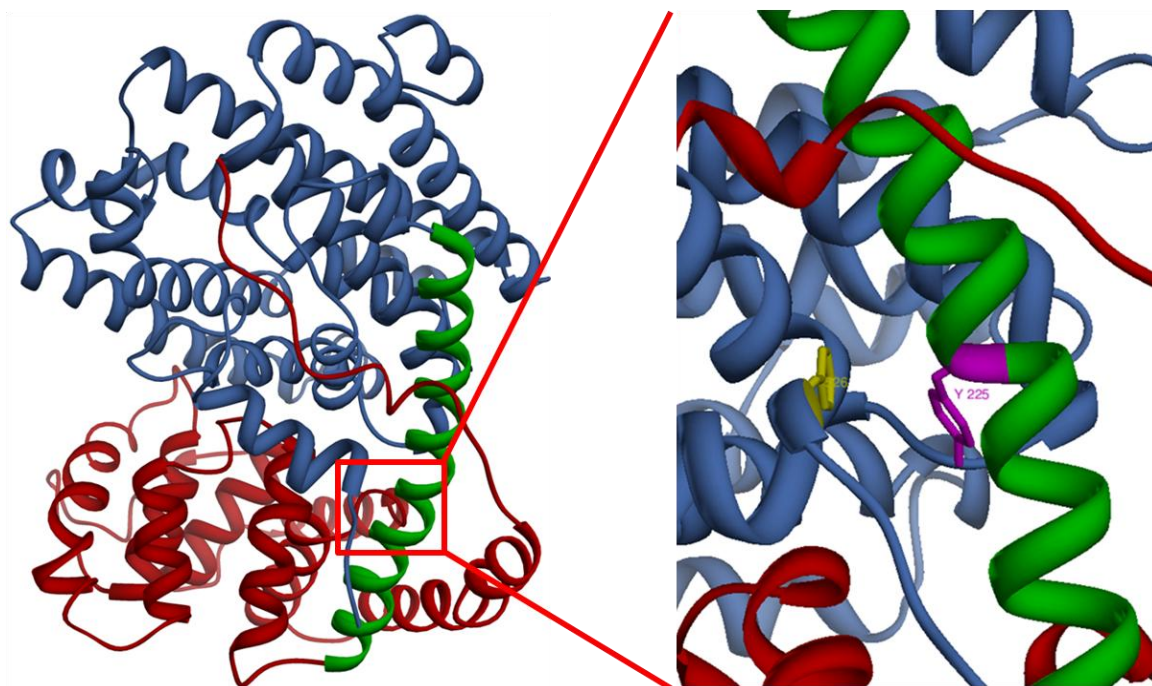


Abb. 25 Stabilisation der Enzymfunktion durch eine C-terminale π - π -Wechselwirkung

Die α -Helix A (grün) wird von den N- und C-terminalen Enden umschlungen. In Experimenten konnte gezeigt werden dass eine Verkürzung der Enden starke Auswirkungen auf die Aktivität hat (Peters, Carter et al. 2003). Da die N-terminale Domäne in Sesquiterpensynthasen keine offensichtliche Funktion hat, vermutet man eine Rolle als Faltungshelfer. Diese Faltung setzt Verbindungen zwischen den Domänen voraus, wobei α -Helix A die Basis für die Faltung der C-terminalen Domäne darstellt.

Die Wechselwirkung die im Bereich des C-terminalen Endes identifiziert wurde, war die π - π -Wechselwirkung zwischen Phenylalanin526 (gelb) und Tyrosin 225 (magenta). Trunkierungsexperimente zeigten zuvor die Bedeutung dieser Region für die Funktion des Enzyms. Tyrosin 225 ist Teil der α -Helix A (grün). Diese bildete den Übergang zwischen N- (rot) und C-terminaler (blau) Domäne. Die Abbildung wurde mit Hilfe des optimierten TPS10-Modell in Chimera 1.5.3rc visualisiert.

3 Ergebnisse

3.2.1 Strukturelle Untersuchung der N- und C-terminalen Enden

Tabelle 6 Übersicht der Mutanten zur strukturellen Funktionsanalyse und Stabilitätsprüfung

Lokation	Trunkierung	Mutation (SDM)	Stabilität
N-terminal	Δ 6	W11L	Δ 6
	Δ 10	W11M	Δ 10
	Δ 13	W11F	Δ 13 W11F
C-terminal	531 Stopp	F526L	531 Stopp
	528 Stopp	F526M	528 Stopp
	525 Stopp	F526W	F526W
	522 Stopp	F526Y	
		F526C F526C+Y225C	
α-Helix		Y225L	TPS10
		Y225W	
		Y225F	
		Y225C	
		C264A	

3.2.1.1 Trunkierungsexperiment des C-terminalen Endes von TPS10

Trunkierungen des C-terminalen Endes reduzieren die Aktivität des Enzyms (Peters, Carter et al. 2003). Ein Einfluss auf das aktive Zentrum erfolgt wahrscheinlich indirekt über die Ausrichtung der A-C- und J-K-Schleife an der α-Helix A (Zerbe, Chiang et al.). Die A-C-Schleife trägt zur Abspaltung des Diphosphats bei, indem durch eine Konformationsänderung Arginine (R249, R251) in die Nähe des C₁ positioniert werden (Starks, Back et al. 1997). Dadurch kann das Diphosphat abgespalten werden. Die J-K-Schleife verhindert durch die postulierte Lidfunktion (Starks, Back et al. 1997; Peters, Carter et al. 2003) den Kontakt des reaktiven Carbokations mit dem Lösungsmittel. Daher sollten bei Trunkierungen Aktivitätsverluste auftreten und/ oder erhöhte Mengen Terpenalkohole gebildet werden.

TPS10 welches aus 533 AS besteht wurde schrittweise verkürzt und ein neues Stopp-Codon angehängt. Zur Klonierung wurde der Vektor pASK-IBA37⁺ mit einer N-terminalen Histidin-Markierung verwendet. Durch Proteinexpression und partielle Reinigung wurden die Proteine A (531Stopp), B (528Stopp), C (525Stopp) und D (522Stopp) erhalten. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration und die trunkierten Proteine wurden unter standardisierten Bedingungen mit den Substraten inkubiert.

Der Assay zeigt bei einer Verkürzung um zwei Aminosäuren (A) und der Verwendung von (*E,E*)-FPP oder (*Z,E*)-FPP keine signifikanten Auswirkungen auf die Terpenbildung. Die Verkürzung um fünf Aminosäuren (B) bildet im Vergleich zum Wildtyp sehr geringe Terpenmengen. C hat noch eine Restaktivität kurz oberhalb der Nachweisgrenze und D ist

3 Ergebnisse

vollständig inaktiv. Das für TPS10 charakteristische Verhältnis zwischen zyklischen und azyklischen Terpenen bleibt bei den aktiven Proteinen erhalten. (Abb. 26). Terpenalkohole wie Nerolidol wurden bei keinem der trunkierten Proteine gebildet. Alle Proteine waren löslich, das heißt es wurden keine Einschlussverbindungen gebildet. Daher fand bei den inaktiven Proteinen keine Umsetzung des Substrats statt.

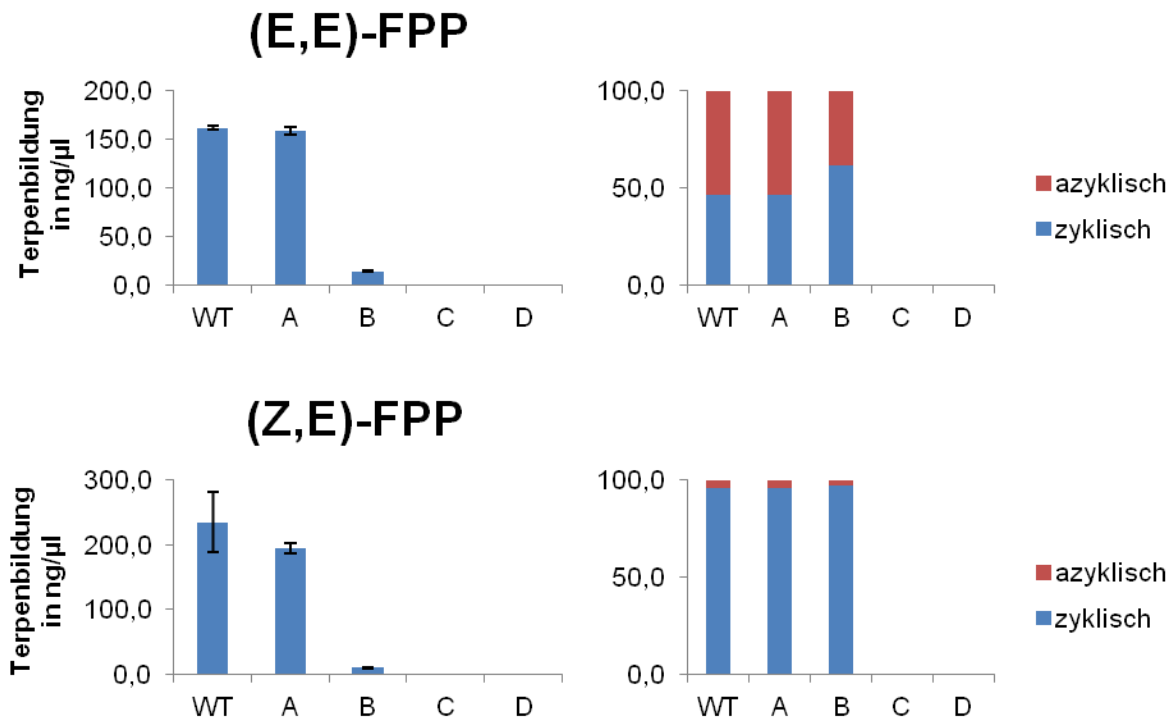


Abb. 26 Auswirkung der Trunkierung am 3'-Ende auf die Enzymaktivität

Trunkierungen am 3'-Ende führten bei Terpensynthasen zu Inaktivität (Peters, Carter et al. 2003) und waren daher für TPS10 von Interesse. Es erfolgte eine schrittweise Verkürzung und Mutanten mit (A) 532AS, (B) 528AS, (C) 525AS und (D) 522AS wurden erstellt. Die Abbildung zeigt in den oberen Diagrammen die Inkubation der Mutanten mit (E,E)-FPP und in den unteren Diagrammen mit (Z,E)-FPP. Links wurde die Gesamtterpenbildung in ng/µl und rechts der dazugehörige Anteil der zyklischen und azyklischen Terpene dargestellt. Mit zunehmender Verkürzung stellte sich bei den Mutanten eine Inaktivität ein. Die Löslichkeit der mutierten Proteine war nicht eingeschränkt. Die Diagramme beruhen auf TIC-Messungen der Mutanten (n=3) mit Polydimethylsiloxan-Fasern nach einer Inkubationszeit von 20 min.

3.2.1.2 Trunkierungsexperiment des N-terminalen Endes von TPS10

Ziel der 5'-Trunkierungsanalyse war es Bereiche mit aromatischen Aminosäuren (AS) schrittweise zu entfernen, um ihren Einfluss auf die Stabilisierung und dem Reaktionsmechanismus zu untersuchen. Daher wurde das 5' Ende analog zu den 3'-Mutanten schrittweise vom Anfang her verkürzt. Aufgrund der Stabilisierung des abgespaltenen Diphosphats durch AS mit positiver Ladung führte dies bei der Abietadien-Synthese zur Reduzierung der Aktivität (Starks, Back et al. 1997; Peters, Carter et al. 2003). Die Trunkierungen in TPS10 (5'-M₁DATA/FHPS/LWG/DFV/K₁₇-3') erfolgten nach A5 (Δ6), S9 (Δ10), G12 (Δ13) und V16 (Δ17). Die aromatischen 5' AS die auf ihre Funktion untersucht werden sollten waren somit F6, W11, F14 und F15. Die Bildung von unlöslichem Protein während der Expression wurde nicht beobachtet. Analog zu den 3'-Mutanten wurden die trunkierten TPS10-Enzyme mit einem geeigneten Puffer zur Reaktion mit (E,E)-FPP und (Z,E)-FPP gebracht und die Produktspektren chromatographisch mit der GC/MS untersucht.

3 Ergebnisse

Bei der Verwendung des natürlichen Substrats (*E,E*)-FPP blieb die Terpenbildung bei $\Delta 6$ und $\Delta 10$ relativ zum Wildtyp konstant und nahm bei $\Delta 13$ rapide ab und blieb bei $\Delta 17$ inaktiv (Abb.27). Im Unterschied zu den Trunkierungen am C-Terminus blieb das Verhältnis von zyklischen und azyklischen Terpenen nicht gleich, sondern verschob sich zugunsten von (*E*)- β -Farnesen, also den azyklischen Produkten. Das Mengenverhältnis der zyklischen Terpene zueinander blieb unverändert. Interessanterweise konnte bei Verwendung des synthetischen Substrats (*Z,E*)-FPP diese Hemmung zur Bildung zyklischer Produkte umgangen werden. Dies wies auf einen Effekt der Trunkierung am 5'-Ende auf die Isomerisierungskaskade (Köllner, Gershenzon et al. 2009) hin. Da bei der 5-*epi*-Aristolochensynthese (Starks, Back et al. 1997) das 5'-Ende an der Bindung des Diphosphats beteiligt ist, sprechen die Ergebnisse von $\Delta 6$ und $\Delta 10$ für die gleiche Interaktion in TPS10.

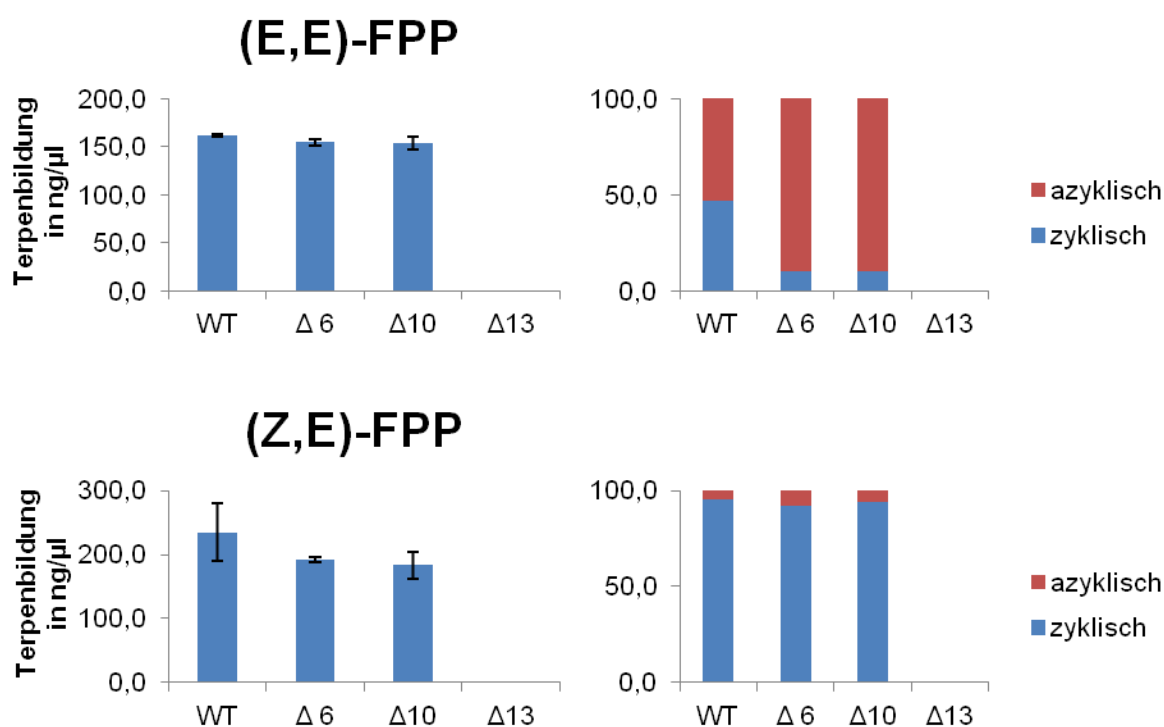


Abb. 27 Auswirkung der Trunkierung am 5'-Ende auf die Enzymaktivität

Die Abbildung zeigt oben die enzymatische Aktivität der trunkierten Mutanten mit (*E,E*)-FPP und unten mit (*Z,E*)-FPP. Links wurde die Gesamtterpenbildung in ng/μl und rechts der dazugehörige Anteil der zyklischen und azyklischen Terpene dargestellt. Die Diagramme beruhen auf TIC-Messungen der Mutanten (n=3) mit Polydimethylsiloxan-Fasern nach einer Inkubationszeit von 20 min.

3.2.1.3 Stabilitätsverbessernde AS am N- und C-Terminus

Die Trunkierungsexperimente zeigten die große Bedeutung von Aminosäuren (AS) außerhalb des aktiven Zentrums für die Aktivität des Enzyms auf. Nachdem die Inaktivität ab einer bestimmten Kürzung der Aminosäuresequenz nachgewiesen wurde stellte sich die Frage, welche Abschnitte für die Funktionserhaltung elementar waren. Dazu wurde das TPS10 Homologiemodell auf stabilisierende Aminosäuren und die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen oder Disulfidbrücken untersucht. Diese wären in der Lage, das Diphosphat und die A-C-Schleife zu stabilisieren bzw. zu fixieren. In den trunkierten Bereichen konnte diese Wechselwirkungen mithilfe des Homologiemodells nicht erklärt werden. Allerdings fiel die Lage von aromatischen AS auf, welche sich im Homologiemodell

3 Ergebnisse

nahe der α -Helix A bzw. der A-C-Schleife befanden. Dies waren Tryptophan 11 und Phenylalanin 526. Auf der α -Helix A wurde mit Tyrosin 225 ebenfalls eine aromatische AS identifiziert. Deshalb wurde eine Wechselwirkung zwischen diesen Aminosäuren vermutet (Abb. 25). Zur Verifizierung habe ich Tryptophan mit Leucin, Methionin und Phenylalanin (W11L, M, F), Phenylalanin analog mit Tryptophan (F526L, M, W) ausgetauscht. Außerdem wurde Tyrosin durch Leucin, Phenylalanin und Tryptophan ersetzt (Y225L, F, W). Die Reaktion der Mutanten wurde mit den Substraten (*E,E*)-FPP und (*Z,E*)-FPP untersucht (Abb.28).

Leucin- und Methionin-Mutanten dienten zur Eliminierung der Bindung und wurden aufgrund der sterischen Ähnlichkeit zu der ursprünglichen AS eingeführt. Beide Substituenten führten in allen Fällen zu einer stark verringerten Terpenbildung. Die Variation mit Tryptophan führte auch zur Senkung der Terpenbildung, hatte an Position 526 (F526W) allerdings eine größere Auswirkung als bei der Tyrosin-Mutante (Y225W). Phenylalanin dagegen senkte die Terpenbildung bei Tyrosin (Y225F) stärker als die entsprechende Tryptophan-Variante (W11F).

Die Mutationsstudien am 3'-Ende zeigen eine Verbindung zwischen dem C-terminalen Ende (F526) und der α -Helix A (Y225) und bestätigen damit die Vermutung einer Wechselwirkung aufgrund der räumlichen Nähe (5,24 Å) im Homologiemodell (Modellauflösung 2,4 Å). Diese vermutete π - π -Wechselwirkung zwischen zwei aromatischen Ringsystemen scheint sehr schwach zu sein. Durch minimale Unterschiede in der Position des aromatischen Rings konnten starke Einflüsse auf die Aktivität gezeigt werden. Diese Ergebnisse wurden durch den Einsatz von (*Z,E*)-FPP bestärkt, da sich der Effekt nicht auf einen Einfluss auf die Isomerisierungsreaktion reduzieren ließ. Das heißt, die Aktivität war bei beiden Substraten gleichermaßen eingeschränkt.

3 Ergebnisse

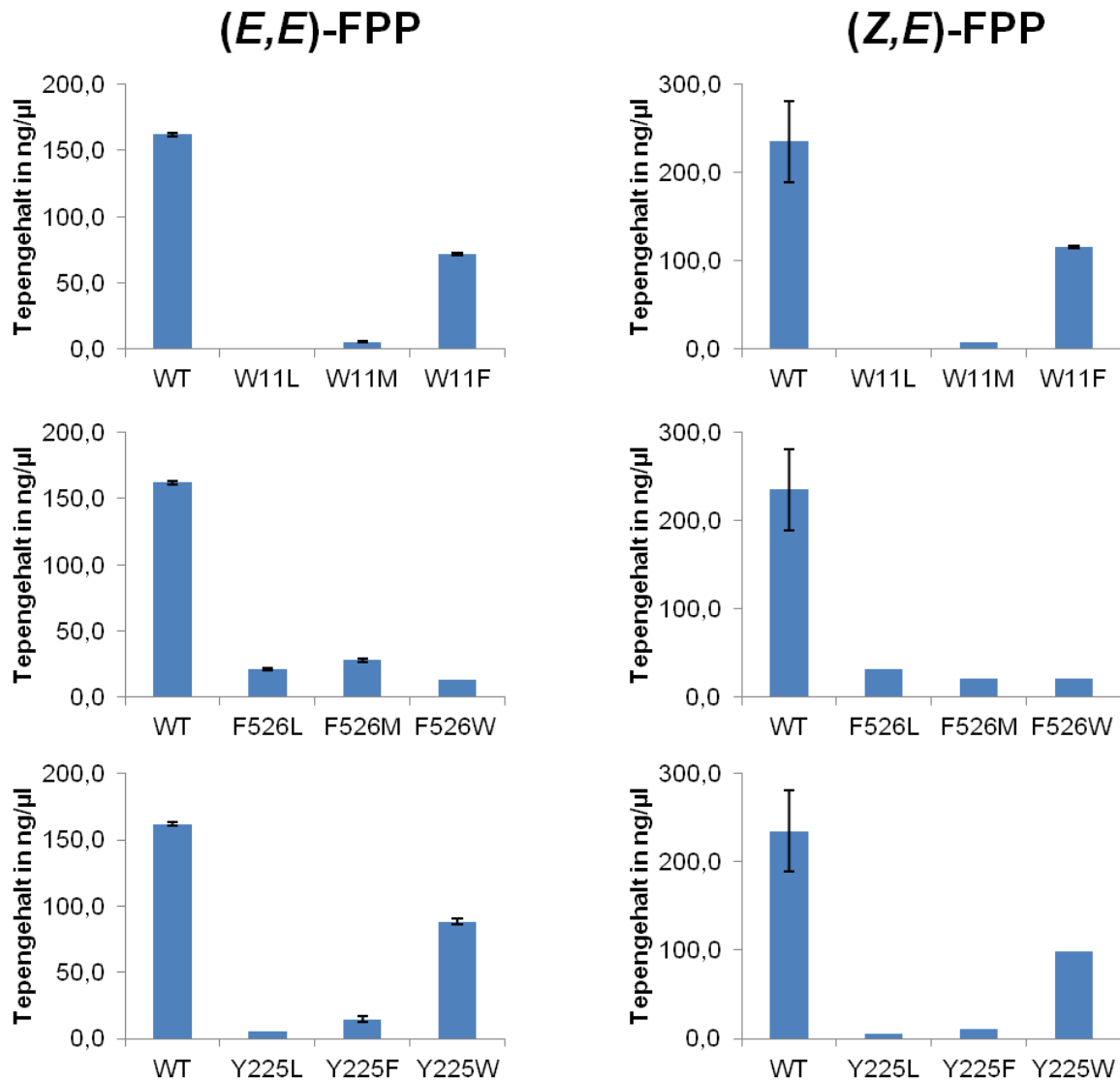


Abb. 28 Mutation von TPS10-Aminosäuren in Schlüsselpositionen für die Funktion

Nachdem es bei den Trunkierungen zur Inaktivität kam wurde das Homologiemodell nach Schlüsselpositionen untersucht. Im Fokus lagen dabei die aromatischen Aminosäuren in den trunkierten Bereichen. Am 5'-Ende wurde (W11), und am 3'-Ende (F526) identifiziert. Als korrespondierende AS zur Ausbildung einer π - π -Interaktion mit F526 wurde auf der α -Helix A (Y225) gefunden. Die Schlüsselpositionen wurden nach dem Ähnlichkeitsprinzip mutiert, d.h. es wurden andere aromatische oder sterisch ähnliche Aminosäuren gewählt. Die Reaktion erfolgte unter Standardbedingungen mit den Substraten (*E,E*-FPP und (*Z,E*-FPP (n=3).

3.2.1.4 Stabilitätsuntersuchung mittels Guanidin HCL Denaturierung

Die Funktion eines Enzyms ist eng verknüpft mit einer korrekten Faltung. Das zeigt sich durch Inaktivität nach einer Denaturierung, welche unter reversiblen Bedingungen wieder zur Proteinaktivität führt. Die Proteinfaltung hängt nur von seiner Aminosäuresequenz ab und ist somit selbstorganisierend (Anfinsen et al. 1956). Die Stabilität eines Proteins bedeutet hier die Toleranz des Proteins gegenüber denaturierenden Einflüssen zur Aufrechterhaltung der nativen (funktionstüchtigen) Konformation. Ist ein Protein inaktiv wurde es entweder inhibiert oder seine Konformation wurde durch Denaturierung verändert. Ziel der Stabilitätsuntersuchungen war es durch Einsatz des chaotropen Salzes Guanidin-HCl

3 Ergebnisse

Unterschiede in der Toleranz der trunkierten und veränderten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu zeigen.

Guanidin-HCl wurde zu einer konstanten Proteinkonzentration in aufsteigender Konzentration pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 52 min bei 30 °C im Wasserbad wurden Fluoreszenzspektren der Proben aufgenommen. Anschließend wurde die Fluoreszenzwellenlänge mit der höchsten Strahlungsintensität betrachtet und die Intensität der Fluoreszenzstrahlung zur Konzentration an Guanidin-HCl aufgetragen.

Dabei zeigte sich die größte Intensität/ Stabilität bei den Wildtypmutanten mit einer Entfaltung bei einer Salzkonzentration von 1 M. Die Fluoreszenzspektren der Mutanten am 5'-Ende zeigten im Vergleich zu TPS10 alle eine schwächere Intensität (Abb. 30) und eine Entfaltung fand bereits bei geringsten Konzentrationen von Guanidin-HCl statt. Die Veränderung W11nach F11 war von den gemessenen Proben am 5'-Ende am stabilsten.

Die am 3'-Ende trunkierten Proteine korrelierten hinsichtlich ihrer Stabilität (Abb.29) erwartungsgemäß mit ihrer Fähigkeit Terpene zu bilden (Abb. 26). Sie nahm also vom TPS10-Wildtyp ausgehend ab. Die Proteinextrakte der Mutanten F526W und 528Stopp zeigten in Korrelation zu ihrer Terpenbildung die schwächste Stabilität.

Leider war ein weiterführender Vergleich aller Mutationen nicht möglich, da die Proteinestabilität nach der Reinigung sehr schwach und eine Lagerung nicht möglich war. Ein Versuch durch eine Erhöhung der Salzkonzentration im Lagerpuffer die Lagerungsstabilität zu erhöhen blieb erfolglos.

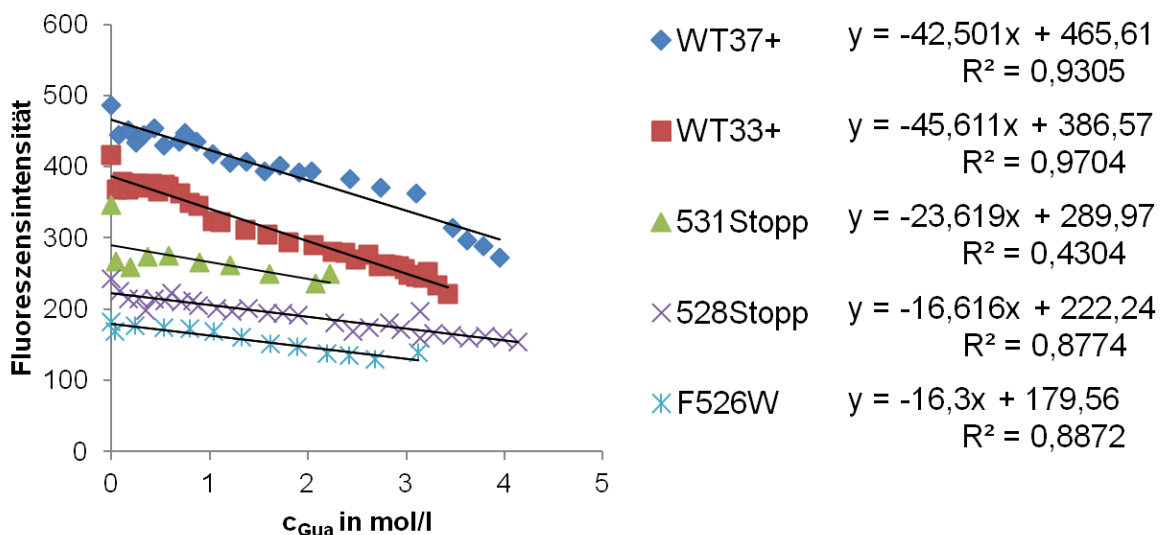


Abb. 29 Stabilitätsuntersuchungen der 3'-Mutanten

Denaturierungen dienten zur Untersuchung der Stabilität der Mutanten und sollten eine Korrelation zwischen Trunkierung und Stabilitätsverlust zeigen, was zum Aktivitätsverlust führt. Die gereinigten Proteinextrakte (1µM) wurden mit einem Guanidin-HCl-Puffer (6 M) in steigender Konzentration 52 min bei 30 °C inkubiert und direkt im Anschluss bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm fluorimetrisch vermessen. Es wurde die Wellenlänge gewählt, welche die maximale Fluoreszenzintensität hatte und zur Guanidin-HCl-Konzentration aufgetragen. Die Stabilität der 3'-Mutanten zeigt eine Verringerung korrelierend zur Aktivität der trunkierten Mutanten.

3 Ergebnisse

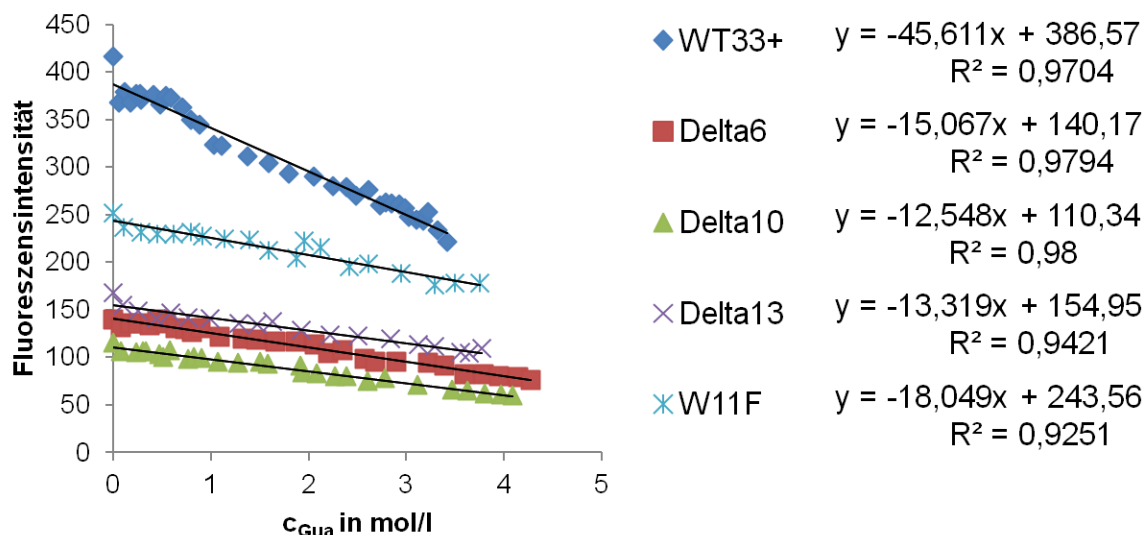


Abb. 30 Denaturierung von 5'-Mutanten

Analog zu den 3'-Mutanten sollte auch das 5'-Ende untersucht werden. Die gereinigten Proteinextrakte (1 μ M) wurden mit einem Guanidin-HCl-Puffer (6 M) in steigender Konzentration 52 min bei 30 °C inkubiert und direkt im Anschluss bei einer Anregungswellenlänge von 280 nm fluorimetrisch vermessen. Es wurde die Wellenlänge gewählt, welche die maximale Fluoreszenzintensität hatte und zur Guanidin-HCl-Konzentration aufgetragen. Im Gegensatz zu den 3'-Mutanten existiert bei den 5'-Mutanten keine Korrelation zwischen Aktivität und Stabilität.

3.2.2 Die Funktion von Aminosäuren im äußeren aktiven Zentrum

Das äußere aktive Zentrum umfasste in meinen Betrachtungen die Metallbindemotive zur Chelatisierung von trinukleären Magnesiumkomplexen (Mg^{2+}_3). Mit Ausnahme von sieben Sesquiterpensynthasen (siehe Punkt 3.1.2.1), lagen bei fast allen Sesquiterpensynthasen zwei Metallbindemotive vor und bildeten den Eingang zum aktiven Zentrum. Mit Hilfe des Multisequenzvergleichs (siehe Punkt 3.1.2.1) erfolgte die Einteilung der veröffentlichten Sesquiterpensynthasen nach Art und Vorkommen der Bindemotive. Damit wurde in weiterführende Untersuchungen die Aussage von (Vedula, Jiang et al. 2008) untersucht, nachdem vor allem in Pflanzen neben einem DDxxD-Motiv auf α -Helix D (Starks, Back et al. 1997), ein DTE-Motiv auf α -Helix H vorkommt. Ein NSE-Motiv sollte demnach bei Enzymen aus Pilzen und Bakterien zu finden sein. Dazu wurde ein $D_{430}T_{434}E_{438}$ -Motiv anstelle des originären NSE-Motiv eingeführt. Die Klärung der Frage wie die Komplexierung des trinukleären Magnesiumkomplex (Mg^{2+}_3) durch die Metallbindemotive erfolgt, sollte ebenso erfolgen wie ein Versuch die Position der Metallbindemotive innerhalb von TPS10 durch gerichtete Mutagenese zu tauschen. Einen kurzen Überblick der durchgeführten Änderungen gibt Tabelle 7 und die Details in den Unterpunkten.

3 Ergebnisse

Tabelle 7 Überblick der Mutanten zu Überprüfung der Thesen

Thema	DDXXD ₂₈₆₋₂₉₀	NSE ₄₃₀₋₄₃₈
Bindung des Mg ²⁺ ₃ Komplex	D286L	N430A
	D287L	E438A
	D287N	N430A + E438A
	D290S	N430A + E438A + S434A
Variation im Metallbindemotiv	-	S434T,G,C,A S434T,G,C + N430D
Motivtausch	D286N + D290S + T294E	N430D + S434D

3.2.2.1 Chelatisierung des trinukleären Mg²⁺₃-Komplex

Am Eingang zum aktiven Zentrum liegt dem NSE-Motiv das aspartatreiche DDxxD-Motiv gegenüber. Diese Metallbindemotive sind bei allen Terpensynthasen konserviert und variieren nur hinsichtlich ihrer Ausprägungsform. Sie chelatisieren zweiwertige Metallionen (Christianson 2006). Drei Magnesiumionen bilden den trinukleären Magnesiumkomplex (Mg²⁺₃), welche wiederum zur Neutralisierung der negativen Ladung des abgespaltenen Diphosphats beitragen (Starks, Back et al. 1997). Somit sind die Metallbindemotive wichtig für die Funktion von ionisationsabhängigen Klasse I Terpensynthasen (Christianson 2006).

Der Austausch von Aminosäuren (AS) der Metallbindemotive DDxxD und NxxxSxxxE, führte in den meisten Fällen zu einer starken Senkung der Aktivität. Analog zu (Peters and Croteau 2002) wurde in das NSE-Motiv schrittweise zu einem unpolaren Alanin mutiert. Daraus ergaben sich drei separate Mutanten (N430A (ASE), S434A (NAE), E438A (NSA)) mit denen der Einfluss jeder Aminosäure untersucht werden konnte. In weiteren Schritten wurden Doppelalaninmutanten (AAE, ASA, NAA), eine Tripelalaninmutante (AAA) erzeugt. Abschließend sollte der Einfluss der Alaninmutation bei der DSE-Variante des NSE-Motiv untersucht werden (DSA). Die Bildung von Terpenen war bei allen Mutanten eingeschränkt (Abb.31). Bei den Monomutanten zeigten das ASE-Motiv und das DSA-Motiv die stärkste Abnahme der Terpenbildung, gefolgt vom NAE-Motiv. Die größte Toleranz gegenüber dem Alaninaustausch bewies das NSA-Motiv, obwohl E438 im Multisequenzvergleich hoch konserviert vorlag (siehe Punkt 3.1.2.1). Normalerweise deutet dies auf eine besondere Wichtigkeit dieser Aminosäure für die Funktion des Metallbindemotivs hin. Alle weiteren Mutationen führten zur Inaktivität von TPS10. Dies unterstreicht die Wichtigkeit des NSE-Motiv für die Chelatisierung und damit der Initiierung der Terpenbildung.

3 Ergebnisse

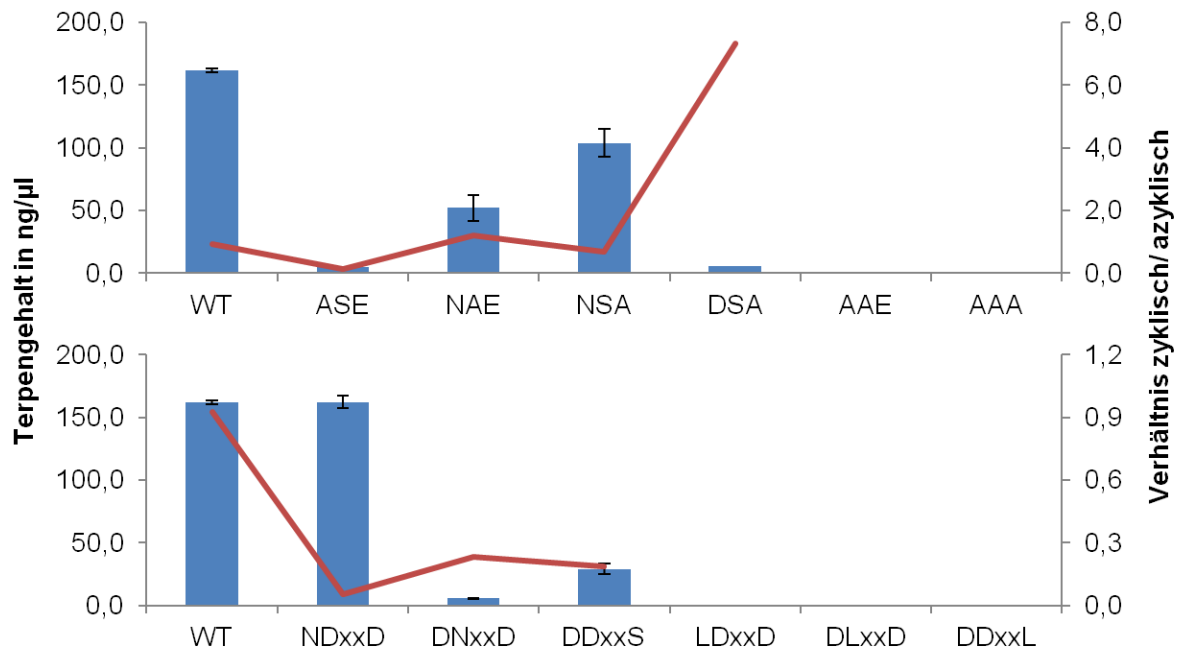


Abb. 31 Einfluss Chelatisierung des trinukleären Magnesium-Komplex (Mg^{2+}_3) auf die Aktivität

Metallbindemotive in Terpensynthasen sind essentiell für die Bindung von Magnesiumionen und dienen somit der Abspaltung des Diphosphats vom Substrat bei Klasse 1 Terpensynthasen (Starks, Back et al. 1997; Christianson 2006). Das obere Diagramm zeigte die Untersuchungen zur Mg^{2+}_3 Bindung des NSE-Motiv. ASE, NAE und NSA stellten Alanin-Mutanten der relevanten Aminosäuren dar, welche dadurch ihre Bindungsfähigkeit zu Mg^{2+}_3 verloren. DSA stand für die Alaninmutante im DSE-Motiv und war vergleichend gedacht. AAE zeigte repräsentativ eine Doppelalaninmutante und AAA die Tripelmutante.

Im unteren Diagramm sieht man die Variation im DDxxD-Motiv. Die Hemmung der Bindungsfähigkeit zum Mg^{2+}_3 erfolgte durch Austausch mit Leucin, Serin oder Asparagin. Die Mutanten (n=3) wurden in zeitlicher Nähe auf ihre Reaktion mit dem Substrat (*E,E*-FPP) getestet. Dazu wurden die partiell gereinigten Proteinextrakte verwendet. Die Berechnung der Konzentration erfolgte anhand von Standardkurven.

Die Funktion der Aspartate wurde analog zum NSE-Motiv mit einer unpolaren Aminosäure ausgeschaltet. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit des Leucins zum Aspartat wurden Einzel-Mutationen mit Leucin erstellt. Zusätzlich wurden Mutanten mit Asparagin (D286N, D287N) und Serin (D290S) erstellt. Diese ähnelten dem Aspartat hinsichtlich der räumlichen Gestalt und einer polaren funktionellen Gruppe. Alle Leucin-Mutanten waren inaktiv. Somit sind alle drei Aspartate für die Chelatisierung des trinukleären Mg^{2+} -Komplex wichtig. Ein Austausch mit Asparagin bzw. Serin zeigte ein etwas differenziertes Bild. An Position D287 und D290 kam es zu starken Aktivitätsverlusten. An Position D286 hingegen wurde die Mutation zu Asparagin gut toleriert (Abb. 31).

3.2.2.2 Tausch der Position des Metallbindemotivs

Die Vielfalt der Metallbindemotive bei Terpensynthasen ist wahrscheinlich aus einem Doppel-DDxxD-Motiv hervorgegangen, d.h. es gibt ein neben dem bei Klasse I Terpensynthasen (Christianson 2006) konservierten DDxxD-Motiv auf α -Helix D, welche Mg^{2+}_A und Mg^{2+}_C chelatisieren, ein zweites DDxxD-Motiv auf α -Helix H (Mg^{2+}_B). Dieses bildet

3 Ergebnisse

bei den phylogenetisch älteren Gymnospermen wie *Abies grandis* (Steele, Crock et al. 1998), *Picea abies* (Martin et al. 2004) und *Picea sitchensis* (Byun-McKay et al. 2006) den Eingang zum aktiven Zentrum und ist bei Klasse I Terpensynthasen im allgemeinen wichtig für die Mg^{2+} abhängige Abspaltung des Diphosphats vom Substrat. Alternativ zum DDxxD-Motiv auf α -Helix H kommen in den meisten Terpensynthasen ein NSE/ oder DTE-Motive vor. In TPS10 deutet die Sequenz um das NSE-Motiv (NDTASTKRE) auf Helix H eine Ähnlichkeit zu den aspartatreichen Metallbindemotiven der Gymnospermen an. Das dem Asparagin folgende Aspartat hochkonserviert (Anhang Tab. I). Ebenso treten analog zu der Position des dritten Aspartats eines DDxxD-Motivs, sehr häufig Aminosäuren mit polaren Seitenketten wie Threonin oder Serin auf. Das Asparagin übernimmt die chelatisierende Funktion des ersten Aspartats (Starks, Back et al. 1997; Christianson 2006). Serin würde in TPS10 mit seiner OH-Gruppe das Analogon des dritten Aspartats darstellen (D290 Helix D). Diese Spekulation wurde aufgrund der guten Akzeptanz von D286N (Abb. 31) verstärkt. Daher ergab sich die Idee die Metallbindemotive zu tauschen.

Der Austausch der Aminosäuren in den Metallbindemotiven erfolgte schrittweise. Im NSE-Motiv wurde zunächst die Glutaminsäure inaktiviert (E438A). Anschließend wurde das Serin in ein Aspartat bzw. Glutamat umgewandelt, um später ein DDxxD-Motiv bzw. ein DDxxE-Motiv zu erzeugen (S434D, S434E). Im letzten Schritt wurde den Austausch von Asparagin durch ein Aspartat (N430D), ein zweites DDxxD- bzw. DDxxE-Motiv erhalten. Nach E438A war die Bildung von Terpenen stark verringert, jedoch nicht inaktiv. Sie war noch ausreichend um das Verhältnis zur Bildung von zyklischen zu azyklischen Terpenen zeigen zu können, was bei N430D deutlich zugunsten der zyklischen Terpene verschoben ist (Abb.32).

Das NSE-Motiv wurde parallel anstelle des DDxxD-Motivs eingeführt. Dazu wurde zunächst das erste Aspartat in ein Asparagin umgewandelt (D286N). In nachfolgenden Schritten mutierte man zuerst das letzte Aspartat in ein Serin (D290S) und abschließend ein Threonin zur Glutaminsäure (T294E). Der erste Austausch D286N zeigte eine gute Terpenbildung bei eingeschränkter Fähigkeit zyklische Terpene zu bilden (zyklisch/ azyklisch=0,06). Die im Verlauf erzeugten Mutanten D290S und T294E (₂₈₆NSE₂₉₄) zeigten eine abfallende Bildung von Terpenen. Bei einer Restbildung von hauptsächlich (*E*)- β -Farnesen (Abb. 32).

3 Ergebnisse

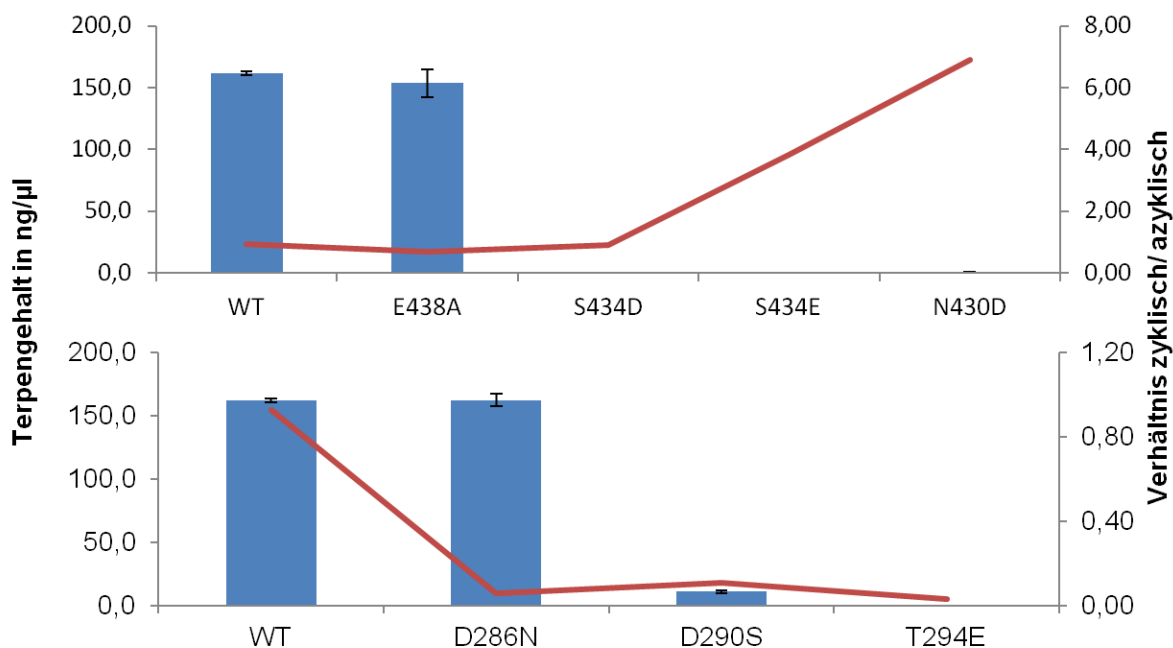


Abb. 32 Positionstausch der Metallbindemotive führt zur Inaktivität der Mutanten

Die Aminosäuresequenz von TPS10 zeigt im Bereich des C-terminalen Metallbindemotivs eine Ähnlichkeit zu einem zweiten DDxxD-Motiv. Dieses sollte in der Lage sein den trinukleären Magnesiumkomplex zu fixieren. Sollte dies funktionieren könnte das N-terminale native DDxxD-Motiv in ein NSE-Motiv umgewandelt werden. Das obere Chromatogramm zeigte die sukzessive Erzeugung des DDxxD-Motivs auf α -Helix H3. Im unteren Diagramm wurde die schrittweise Einführung des NSE-Motivs auf α -Helix D dargestellt. Der Austausch der Motive führte schon bei kleinen Veränderungen zu einer verminderten Aktivität, welche bei weiteren Schritten zur Inaktivität wurde. Der Tausch der Motive war ebenfalls inaktiv und wurde hier nicht gezeigt. Die partiell gereinigten Proteinextrakte aller Mutanten (n=3) wurden mit (E,E)-FPP 20 min inkubiert und GC-chromatographisch vermessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte anhand von Standardkurven.

3.2.2.3 Variation des NSE-Motiv und Auswirkung auf das Terpenverhältnis.

Nach Klärung der für die Chelatisierung des trinukleären Magnesiumkomplexes wichtigen Aminosäuren im Metallbindemotiv (s. Kapitel 3.2.2.1) sollten folgend die Variationsmöglichkeiten in der Motivmitte des C-terminalen Metallbindemotivs untersucht werden. (Vedula, Jiang et al. 2008) zeigte anhand der Trichodien synthese aus *Fusarium sporotrichioides* die Veränderungen des NSE-Motivs, wie es hauptsächlich bei Bakterien und Pilzen vorkommt, in ein bei Pflanzen vorkommendes DTE-Motiv. Dies führte zu einem starken Aktivitätsverlust der Pilz-Trichodien synthase.

Bei Untersuchungen des zweiten Metallbindemotivs konnte durch den Austausch der für die Metallbindung wichtigen Aminosäuren mit Alanin eine starke Senkung der katalytischen Effizienz gezeigt werden (Peters and Croteau 2002). (Zhou and Peters 2009) zeigten bei Veränderungen der Motivmitte dass die Hydroxyl-Gruppe eines Serins für die Metallbindung wichtig ist, jedoch variabel durch Threonin und Glycin ersetzt werden kann. Bei Glycin wurde angenommen, dass ein Wassermolekül die Funktion der Hydroxyl-Gruppe als eine Art Platzhalter übernimmt.

3 Ergebnisse

Für die Untersuchung an dem NSE-Motiv von TPS10 ersetzt drei polare und eine unpolare Aminosäure das polare Serin434 in der Motivmitte. Die polaren AS waren Threonin (NTE), Glycin (NGE) und Cystein (NCE). Diese sollten in der Lage sein Wasserstoffbrückenbindungen zum Mg^{2+}_B aufzubauen. Glycin sollte aufgrund der kurzen Seitenkette ein Wassermolekül als Platzhalter einsetzen können und somit das Mg^{2+}_B stabilisieren. Das unpolare Alanin (NAE) stellte eine Kontrolle dar, da es keine Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann. Aufgrund der vermehrten Bildung von zyklischen Terpenen bei einer Mutation von Asparagin zu Aspartat (Abb. 33, N430D), wurde diese Mutation als Einzelmutteration in TPS10 eingeführt. Dieses DSE-Motiv wies eine mit TPS10 vergleichbare Gesamtbildung von Terpenen auf und die Betrachtung auf qualitativer Ebene hinsichtlich differenzierter Terpenverhältnisse konnte somit erfolgen. Die Beobachtung beim DAS-Motiv hinsichtlich der Verschiebung zu mehr zyklischen Terpenen bei Gabe von (*E,E*)-FPP manifestierte sich im DSE-Motiv (Abb. 33). Daraufhin erfolgte zusätzlich die Einführung von Glycin (DGE), Cystein (DCE) und Threonin (DTE) als polare AS anstelle des Serin Position 434. Die Funktion des Enzyms war bei der DGE-Variante mit einem Terpengesamtgehalt von 4,7ng/μl stark eingeschränkt. DTE und DCE wiesen einen mittleren Gehalt mit 50 ng/μl auf. Dies war für weitere Betrachtungen ausreichend.

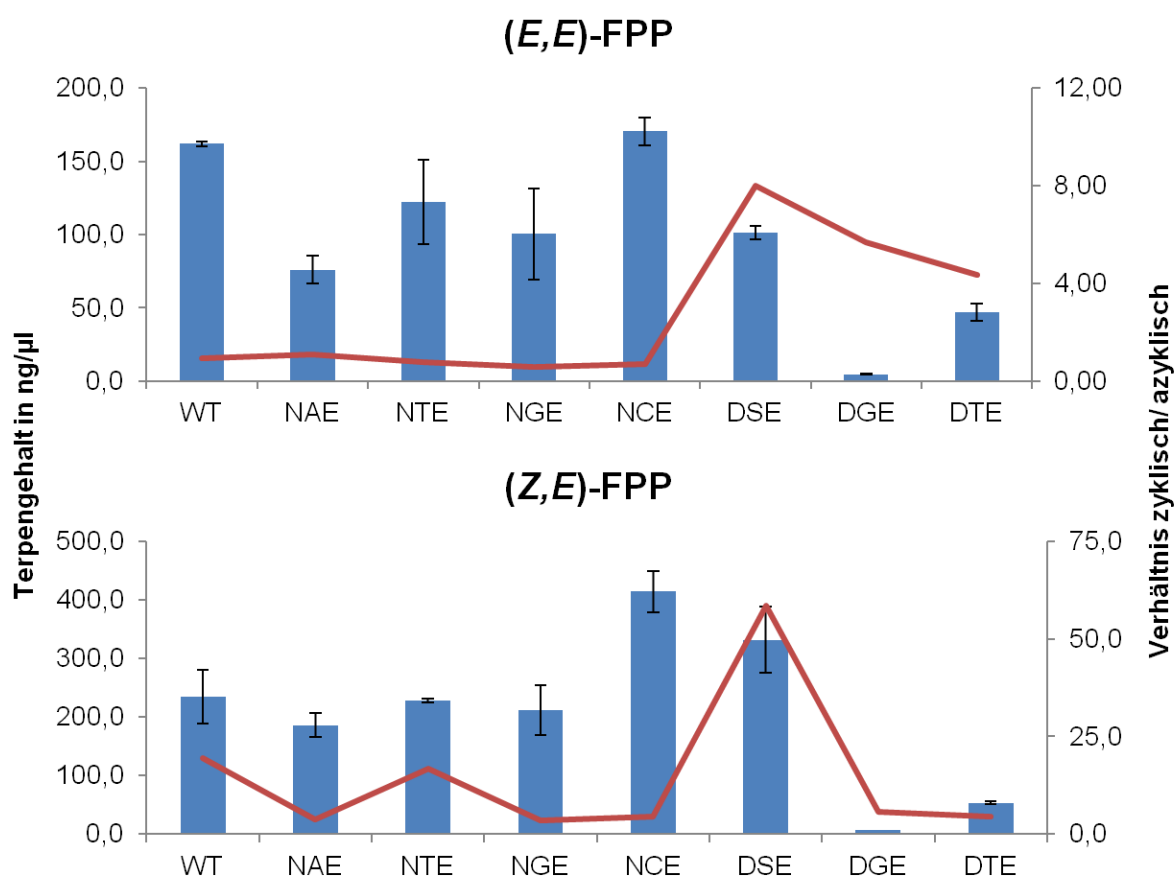


Abb. 33 Variation der mittleren Aminosäure im NSE- und DSE-Motiv

Die mittlere Aminosäure des NSE-Motivs stellt eine variable Position des Metallbindemotivs dar. So konnte durch die Mutation mit Alanin eine Verringerung der Aktivität (Peters and Croteau 2002) und die Akzeptanz von Glycin, Serin und Threonin gezeigt werden (Zhou and Peters 2009). Diese Experimente wurden auf TPS10 übertragen. Das obere Diagramm zeigt die Abbildung die Reaktion mit (*E,E*)-FPP. Durch die teilweise leicht beeinträchtigte Isomerisierungsreaktion wurden die Mutanten zusätzlich mit (*Z,E*)-FPP inkubiert (unten). Es wurde bei allen Mutanten eine Aktivität festgestellt welche oft mit einer Einschränkung der Isomerisierung korreliert.

3 Ergebnisse

Überraschend war die verstärkte Bildung von zyklischen Terpenen bei den DSE-Varianten. Die partiell gereinigten Proteinextrakte aller Mutanten (n=3) wurden mit beiden Substraten jeweils 20 min inkubiert und GC-chromatographisch vermessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte anhand von Standardkurven.

Da bei der Mutation des NSE-Motiv eine Verschiebung zugunsten von azyklischem (*E*)- β -Farnesen bei Umsetzung von (*E,E*)-FPP festgestellt wurde, wurde die Bildung zyklischer Terpene mit (*Z,E*)-FPP untersucht (Abb.34). Ein weiterer Vorteil sind die größeren Mengen zyklischer Produkte. Das TPS10 Enzym (WT) bildete im Durchschnitt (*E*)- α -Bergamoten (81 %), β -Sesquiphellandren (9 %), β -Bisabolen (4 %), Zingiberen (3 %), Sesquisabinen A (2 %) und 7-*epi*-Sesquithujen (1 %). Bei der Mutation mit Threonin blieb dieses Verhältnis annähernd erhalten. Das DSE-Motiv zeigte eine Absenkung des Anteils an (*E*)- α -Bergamoten (67 %), dafür verdoppelte sich der Anteil β -Sesquiphellandren (20 %) und der Anteil von Sesquisabinen A (6%) stieg leicht an. Der Austausch des Serins mit Alanin, Glycin oder Cystein ergab eine weiter Absenkung des (*E*)- α -Bergamoten Anteils (40 %). Was hier auffällt ist die starke Zunahme von Zingiberen (22 %) und β -Sesquiphellandren (27 %) im Vergleich zum NSE-Motiv. Die DSE Varianten zeigten ähnliche Werte und werden daher nicht gesondert betrachtet.

3 Ergebnisse

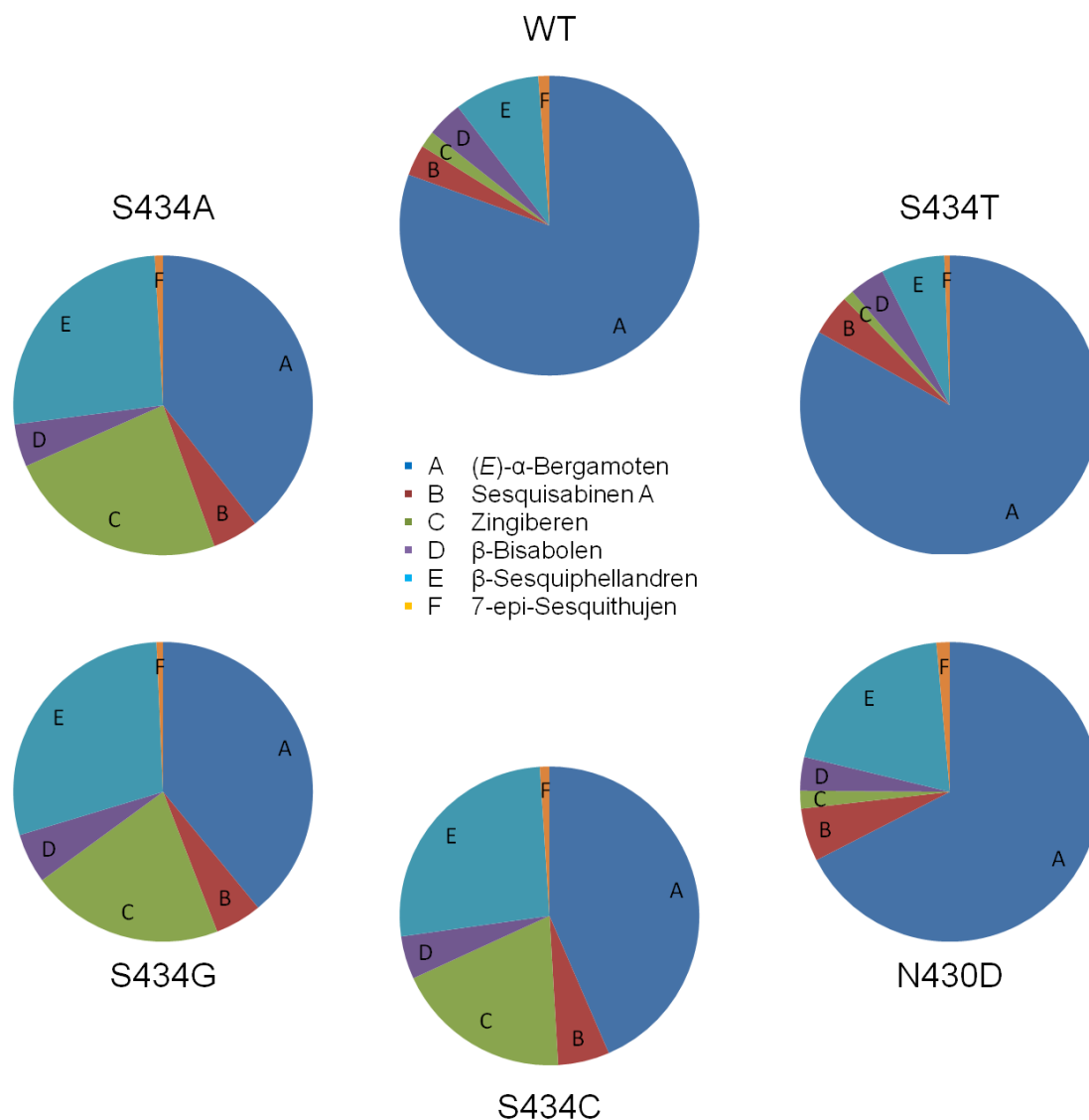


Abb. 34 Veränderung der Enzymspezifität durch Variation der Metallbindemotive

Aufgrund der eingeschränkten Isomerisierung bei einigen Mutanten erfolgte die Gegenüberstellung der Mutationen durch Inkubation mit (*Z,E*)-FPP. Auffällig war die Veränderung der Bildungsverhältnisse der zyklischen Terpene zueinander. Die partiell gereinigten Proteinextrakte aller Mutanten ($n=3$) wurden mit (*Z,E*)-FPP 20 min inkubiert und GC-chromatographisch vermessen.

Mutationen im Bereich des NSE-Motiv führen in einigen Fällen zu einer geringeren Spezifität bei der Bildung zyklischer Terpene oder im Fall des DTE-Motiv zu einer leichten Erhöhung der Produktspezifität. Zusammenfassend wurde damit die Wichtigkeit des zweiten Metallbindemotivs für die Multiproduktbildung beschrieben.

3 Ergebnisse

3.2.3 Die Funktion von Aminosäuren im inneren aktiven Zentrum

Bei der Betrachtung der Produktbildung wurde der Fokus nach Abschluss der Arbeiten an den Metallbindemotiven auf den Innenraum des aktiven Zentrums gelegt, um den Reaktionsmechanismus in TPS10 besser verstehen zu lernen. Dazu wurden die Bereiche Carbokationstabilisierung, Substrataktivierung und die Deprotonierung separat untersucht und zur Übersicht in Tab. 8 dargestellt und in den folgenden Kapiteln näher beschrieben.

Tabelle 8 Übersicht der Mutationen im aktiven Zentrum

Thema	π - π -Interaktion	Arginine	Deprotonierung	katal. Kaskade	Sonstige
Mutation	F498L	R427A	D510A	E508L	N430K
	F498M	R427G	D510M	T509A	Q443E
	F512L	R427E	D510C	T501A	Q443L
	F512M	R437L		D250L	E363D
	F514L	R437H		D497L	E363L
	W258F+N430D	R437E		C255A	
	W258F	R367L		C255D	
	W258L	R367H		E254D	
	W258Y	R367E		E258A	
	W258M	R249L		M505A	
		R249H		M505C	
		R249E		M505L	

3.2.3.1 C^+ - π -Interaktionen Sandwichkomplex

Bei der Multiproduktbildung muss das Enzym in der Lage sein, mehrere parallele Reaktionen zu katalysieren, so dass verschiedene reaktive Intermediate gebildet werden. Um diese Vielzahl von Intermediaten zu ermöglichen braucht es im aktiven Zentrum ein Umfeld, welches die Stabilisierung dieser Intermediate ermöglicht. Eine Möglichkeit ist die Stabilisierung der Carbokationen über π -Elektronensysteme (Christianson 2006). Im Homologiemodell von TPS10 zeigte sich gegenüber dem Eingang zum aktiven Zentrum ein Bereich, in dem viele aromatische Aminosäuren konzentriert sind. Bezugnehmend auf die α -Helix-Nomenklatur bei Terpensynthasen (Starks, Back et al. 1997) fiel besonders ein zentrales Tryptophan (W258) auf Helix C auf, welches durch Phenylalanin (F498) auf Helix J und die Phenylalanine (F512, F514) in der Loopregion zwischen Helix J und K flankiert wurde. Die aromatischen Ringsysteme umschließen das Substrat und sorgen aufgrund des Elektronenüberschuss für die Stabilisierung von Carbokationen (Szczyzny 2011). Die Informationen aus dem Modelling sollten nun weiter untersucht werden.

Um den stabilisierenden Effekt aromatischer Ringsysteme auszuschalten, wurden die Aromaten durch Leucin ersetzt. Leucin wurde von den nicht aromatischen, unpolaren, hydrophoben Aminosäuren gewählt, da es keine besonderen funktionellen Gruppen aufweist und den großen aromatischen Ringsystemen sterisch am nächsten kommt. Die Gesamtbildung von Terpenen war vergleichbar mit dem Wildtyp (Abb. 35). Was auffiel war die stark verringerte Produktion von zyklischen Terpenen bei Gabe von (*E,E*)-FPP in der Tryptophan-Mutante (W258L) und der Phenylalanin-Mutante (F512L). Die anderen beiden

3 Ergebnisse

Phenylalanine zeigten im Vergleich zum Wildtyp eine kaum veränderte Gesamtbildung zyklischer Terpene. Mit der Gabe von (*Z,E*)-FPP sollte geschaut werden ob die fast ausschließlich (*E*)- β -Farnesen produzierenden Mutanten (W258L, F512L) noch generell zur Bildung von zyklischen Produkten befähigt waren oder die Mutation die Bildung zyklischer Terpene generell verhindert. Das Experiment zeigte die Möglichkeit zur Bildung zyklischer Produkte bei allen Mutanten (Abb. 35) und damit die Einschränkung der Isomerisierungsreaktion bei W258L und F512L.

Neben den Leucin-Mutanten wurden an den benannten Positionen Methionin (W258M, F498M, F512M), Phenylalanin (W258F) und Tyrosin (W258Y) eingeführt. Der Austausch mit Methionin sollte klären, ob die Elektronendichte der Thioether-Funktion ausreicht, um Carbokationen zu stabilisieren. Durch eine Verkürzung der Seitenkette durch Mutation von Tryptophan zu Phenylalanin sollten sterische Einflüsse der Seitenkette beobachtet werden. Tyrosin zeigte den Einfluss eines veränderten π -Elektronensystem. Außerdem sollte durch den Austausch an oben genannten Positionen überprüft werden, an welcher Position des reaktiven Intermediats ein Carbokation stabilisiert wird. Dadurch wäre die Bildung eines oder mehrerer Terpene aus dem Produktspektrum erhöht und man könnte idealerweise die Enzymspezifität für ein bestimmtes Produkt erhöhen. Die Gesamtbildung der oben genannten Mutanten wurde nicht dargestellt, da die Terpenbildung analog zu den Leucin-Mutanten vergleichbar mit dem Wildtyp war. Desweiteren wurde eine analoge Verschiebung der zyklischen Terpenanteile beobachtet.

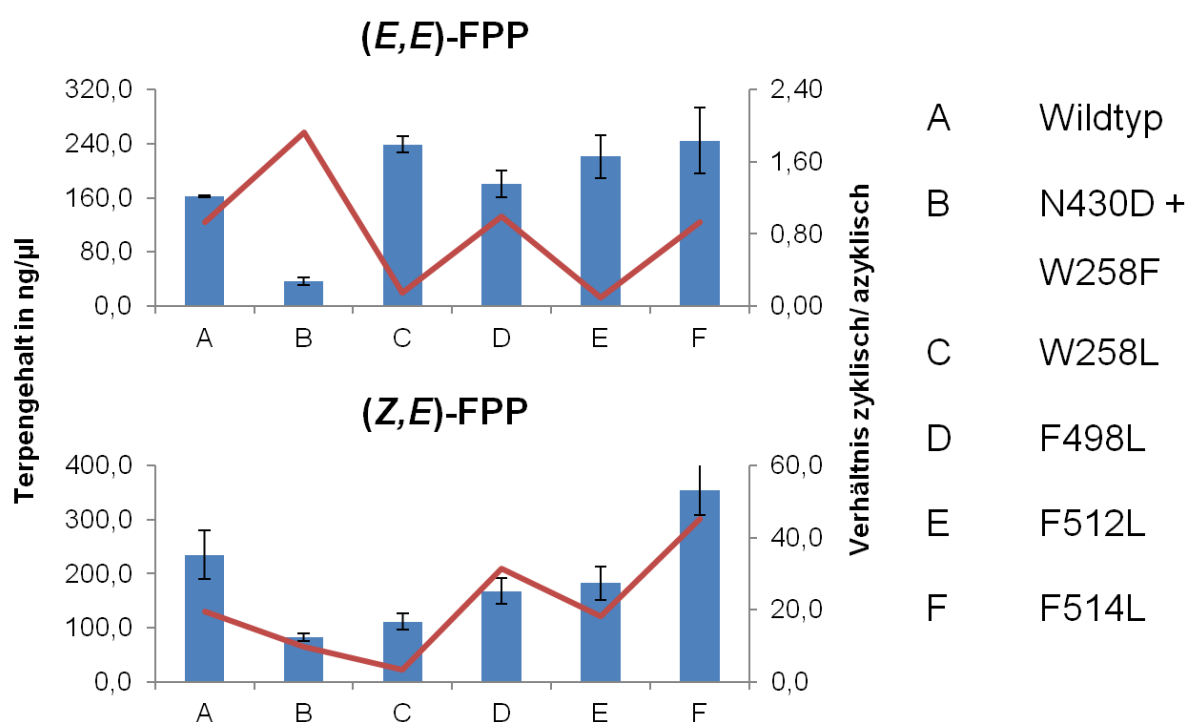


Abb. 35 Intermediatstabilisierung über π -Wechselwirkungen

Aus den Untersuchungen am Homologiemodell von TPS10 lassen sich Aminosäuren ableiten die Zwischenprodukte des Reaktionsmechanismus stabilisieren. Diese aromatischen Aminosäuren wurden durch Leucin ersetzt um die stabilisierende Funktion der π -Elektronensysteme auszuschalten. Die Mutanten (n=3) wurden mit (*E,E*)-FPP und (*Z,E*)-FPP 20 min inkubiert, mit GC/MS vermessen und der Terpenegehalt bestimmt.

3 Ergebnisse

Durch die Reaktion mit (*Z,E*)-FPP konnten die veränderten Positionen W258, F498, F512 und F514 miteinander verglichen werden, da der Einfluss der Isomerisierungsfunktion ausgeschaltet wurde. Dies zeigte interessante Ergebnisse hinsichtlich veränderter Produktionsverhältnisse zyklischer Terpene aufgrund minimaler Veränderungen im Enzym und der damit einhergehenden Verschiebung stabilisierender Elemente.

Tryptophan an Position 258 (Abb. 36) stellte ein gutes Beispiel dar. W258M zeigte bei β -Bisabolen (32 %) als Hauptprodukt, gefolgt von β -Sesquiphellandren (25 %), (*E*)- α -Bergamoten, Zingiberen (15 %) Sesquisabinen A (7 %). Das Hauptprodukt bei W258Y stellte β -Sesquiphellandren (43 %) gefolgt von (*E*)- α -Bergamoten (22 %), β -Bisabolen (14 %), Zingiberen (11 %) und Sesquisabinen A (10 %). Die Verteilung in W258F gestaltete sich ähnlich der Tyrosin-Mutante. Bei dem Austausch mit Leucin (W258L) blieb wie im Wildtyp (*E*)- α -Bergamoten (29 %) das Hauptprodukt gefolgt von β -Sesquiphellandren (28 %), β -Bisabolen (23 %), Zingiberen (12 %) und Sesquisabinen A (8 %). 7-*epi*-Sesquithujen (0-1 %) zeigte in allen Mutanten keine Veränderung. Die Abweichungen vom Wildtyp (Abb. 35) zeigten die Wichtigkeit dieses Tryptophans für die spezifische Bildung von (*E*)- α -Bergamoten. Wenig Raum im aktiven Zentrum führte zu einem sterischen Zwang eine zweite Zyklisierung auszubilden. Durch eine Vergrößerung des Raums wurde dieser Zwang aufgehoben und mehr Monozyklen gebildet (W258L, M, F, Y). Substituenten mit aromatischen Seitenketten führen zu vergleichbaren Ergebnissen (W258F, Y). Sie unterscheiden sich jedoch in den Effekten der Stabilisierung zu der Thioethergruppe (W258M) und einer einfachen hydrophoben Gruppe (W258L).

3 Ergebnisse

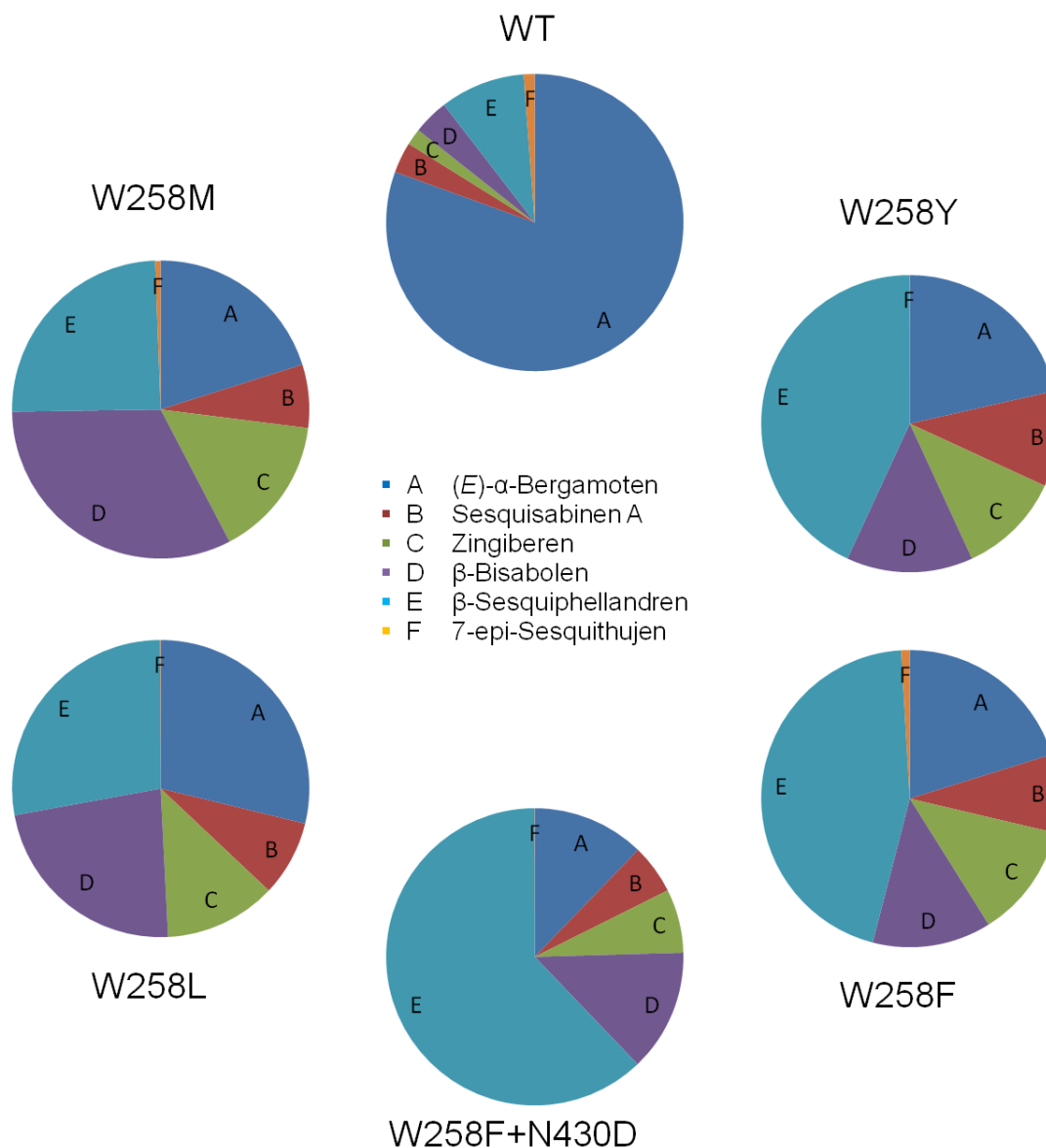


Abb. 36 Mutationen an Position 258 führen zu einer veränderten Produktbildung aufgrund des veränderten Stabilisierungsverhalten im aktiven Zentrum der Mutanten

Mutation an Position 258 beeinflusste die Stabilisierung der Intermediate und führte zu unterschiedlichen Produktverhältnissen. Die dargestellten Mutanten ($n=3$) wurden mit (*Z,E*)-FPP inkubiert, da die Isomerisierungsreaktion mit (*E,E*)-FPP eingeschränkt war. Eine Ausnahme bildete die Doppelmutante welche auch mit (*E,E*)-FPP aktiv war, zur Vergleichbarkeit aber mit ebenfalls mit (*Z,E*)-FPP zur Reaktion gebracht wurde. Die Reaktion und Chromatographie erfolgte standardisiert. Der Gehalt wurde mit Standardkurven bestimmt.

Die Einschränkung der Isomerisierungsreaktion durch Mutation (W258X, F512X) wurde durch eine Doppelmutation umgangen. Dazu wurde ein DSE-Motiv in die W258F-Mutante eingeführt. Im Ergebnis konnte dadurch die Funktion des Enzyms wieder hergestellt werden. Die Gesamtbildung von Terpenen war jedoch bei beiden Substraten gegenüber dem Wildtyp reduziert (Abb. 37). Auffällig war beim Vergleich der zyklischen Produkte die verstärkte Bildung von β -Sesquiphellandren (62 %; +19 %) im Vergleich zur Einfachmutante (W258F). Die Bildung von β -Bisabolen (13 %) blieb dagegen konstant. Die stärkere Bildung von β -

3 Ergebnisse

Sesquiphellandren ging dagegen stark zu Lasten von (*E*)- α -Bergamoten (12 %; -10%) und Zingiberen (7 %; -5 %).

Die Phenylalanine (F498, F512, F514) zeigen ein differenzierteres Bild. So war die Terpenbildung der Mutanten mit (*E,E*)-FPP und (*Z,E*)-FPP vergleichbar mit der des Wildtyps. Der Anteil zyklischer Produkte schwankte bei Verwendung von (*E,E*)-FPP. Er lag bei F498-Mutanten etwas über dem vom Wildtyp und reduzierte sich bei F512-Mutanten analog zu den W258-Mutanten auf nahezu Null (Abb. 37). Eine geringere Spezifität wie bei den W258-Mutanten konnte, bei Nutzung des (*Z,E*)-FPP, nur bei F512-Mutanten beobachtet werden. Der Effekt war weniger stark ausgebildet und (*E*)- α -Bergamoten blieb bei F512L (50 %) und F512M (63 %) Hauptprodukt. Eine starke Zunahme von Sesquisabinen A (14 %) konnte in der Mutante F512L beobachtet werden. Im Vergleich zur Methionin Variante (F512M) geschah dies auf Kosten der Bildung von (*E*)- α -Bergamoten (Abb. 37), da die restlichen zyklischen Produkte kaum schwankten.

Phenylalanin 498-Mutanten wiesen keine Veränderung bei der Bildung zyklischer Terpene im Vergleich zum Wildtyp auf.

Bei dem in der Loop-Region positionierten F514 war es laut Homologiemodell nicht eindeutig ob es einen Teil des aktiven Zentrums darstellt, da die Algorithmen der Computermodelle keine eindeutige Aussage treffen konnten. Idealerweise würden Aufnahmen der Kristallstrukturen von TPS10 mit und ohne Substratbindung vorliegen. Bei der 5-*epi*-Aristolochensynthese wurde eine Konformationsänderung der J-L-Schleife festgestellt (Starks, Back et al. 1997), welche die Region analog zu F514 in TPS10 darstellt und sie in Richtung des aktiven Zentrums verschiebt. Die Mutation zu Leucin zeigte daher eine gezieltere Bildung von (*E*)- α -Bergamoten (91%) und übertraf damit sogar den Wildtyp in der Produktspezifität. Die Bildung der übrigen zyklischen Terpene erfolgte in der Reihenfolge ihrer gebildeten Anteile analog zum Wildtyp.

3 Ergebnisse

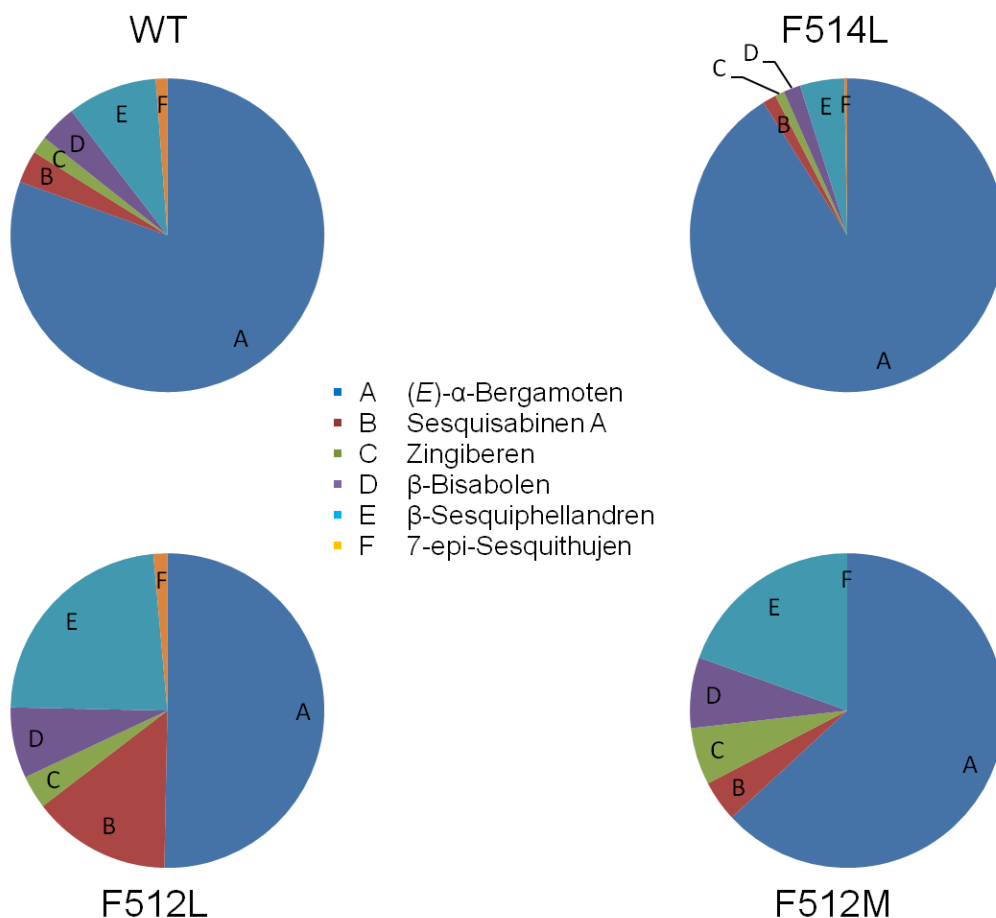


Abb. 37 Mutationen der Phenylalanine zeigen einen Einfluss auf die Stabilisierung der Intermediate

Im aktiven Zentrum stabilisieren Phenylalanine Intermediate des Reaktionsmechanismus. Untersucht wurden die Positionen F498, F512 und F514. Die Mutationen der relevanten Phenylalanine beeinflussten die Intermediatstabilisierung und führten zu differenzierten Produktverhältnissen. Die dargestellten Mutanten ($n=3$) wurden mit (*Z,E*)-FPP inkubiert, da die Isomerisierungsreaktion mit (*E,E*)-FPP eingeschränkt war. Die Reaktion und Chromatographie erfolgte standardisiert. Der Gehalt wurde mit Standardkurven bestimmt.

3.2.3.2 Arginine

Arginine spielen in Terpensynthese bei der Aktivierung des Substrats eine wichtige Rolle. So ist das Doppelargin-Motiv (RxR-Motiv) für die Bindung der Diphosphatgruppe nach Abspaltung vom Substrat wichtig (Starks, Back et al. 1997). Diese RxR-Motiv bilden in TPS10 R249 und R251. Durch die Untersuchungen der Arbeitsgruppe PD W. Brandt wurden weitere Arginine (R367, R427, R437) identifiziert, welche einen Einfluss auf die Substrataktivierung haben könnten. Diese wurden daraufhin durch Leucin, Histidin und Glutamat ersetzt und die Aktivität mit (*E,E*)-FPP und (*Z,E*)-FPP überprüft (Abb. 38). Die Argininmutanten des Doppelarginin-Motiv zeigten genau wie R427 keine Aktivität. R367 und R437 hingegen zeigten bei Verwendung von (*E,E*)-FPP einen deutlichen Effekt auf die Isomerisierungsreaktion und eine verminderte Bildung bei Verwendung des synthetischen (*Z,E*)-FPP als Substrat. Das Bildungsverhältnis der zyklischen Terpene veränderte sich bei R367-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp nicht.

3 Ergebnisse

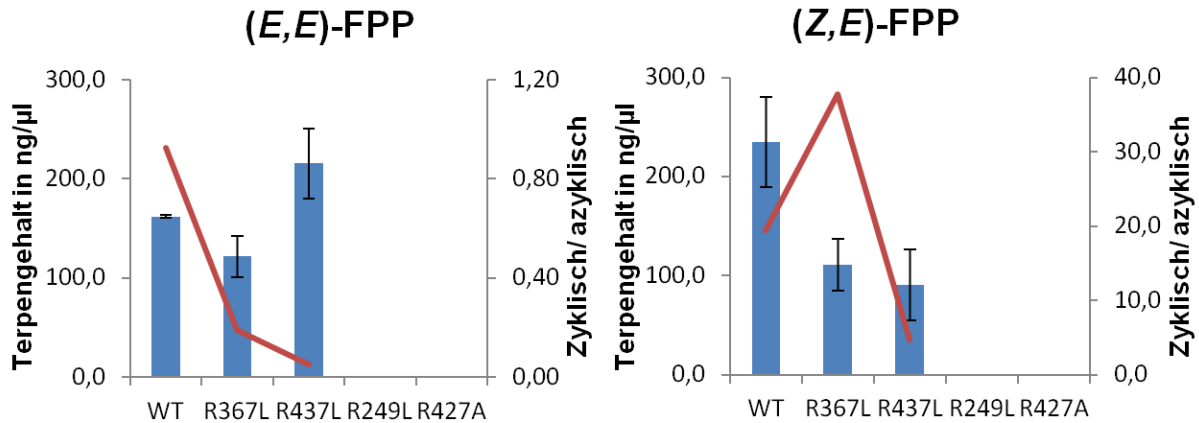


Abb. 38 Die Arginine im aktiven Zentrum beeinflussen die Initiation des Reaktionsmechanismus

Arginine dienen zur Stabilisierung des Ionisationskomplex bei Klasse 1 Terpensynthasen. Das führt zur Abspaltung des Diphosphats und startet den Reaktionsmechanismus. Dieser Mechanismus sollte bei TPS10 untersucht werden. Mutationen der relevanten Arginine zeigten je nach Position differenzierte Ergebnisse. So kommt es bei R249 und R427 zur Inaktivität, R367 ist indifferent und R437 beeinflusst nur die Isomerisierung. Die dargestellten Mutanten (n=3) wurden mit (E,E)-FPP und (Z,E)-FPP inkubiert. Die Reaktion und Chromatographie erfolgte standardisiert. Der Gehalt wurde mit Standardkurven bestimmt.

Die R437-Mutanten hingegen zeigten bei der Reaktion mit (Z,E)-FPP eine veränderte Verteilung zyklischer Terpene untereinander und im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 39). Der Austausch mit unpolaren Leucin ließ die Hauptprodukte (E)- α -Bergamoten (33 %) und β -Sesquiphellandren (32 %) zu gleichen Teilen entstehen. Zingiberen (14 %) und β -Bisabolen (13 %) wurden ebenfalls zu gleichen Teilen gebildet, wobei β -Bisabolen bei dieser Mutante den größten aller R437-Mutanten ausmachte. Sesquisabinen A (8 %) wurde im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls vermehrt gebildet. Ein ebenfalls basisches Histidin, welches durch die AG PD W. Brandt als Ersatzbase vorgeschlagen wurde, ließ den Anteil (E)- α -Bergamoten (53 %) weniger stark sinken. Der Anteil an β -Bisabolen (3 %) und Sesquisabinen A (4 %) blieb überraschend auf dem Niveau des Wildtyps. Die Bildung von β -Sesquiphellandren (23 %) und Zingiberen (16 %) fand deutlich vermehrt statt. Man sah also einen deutlichen förderlichen Effekt bei der Bildung dieser beiden Monozyklen. Durch Variation mit der sauren Glutaminsäure ergab sich ein Bild, welches eine Kombination aus den beiden voran gegangenen Mutationen darstellte. (E)- α -Bergamoten (36 %) und β -Sesquiphellandren (28 %) wurden annähernd zu gleichen Teilen gebildet und der Anteil von β -Bisabolen (4 %) und Sesquisabinen A (5 %) bewegte sich auf Wildtypniveau. Zingiberen (26 %) hingegen zeigte bei dieser Mutante den höchsten bisher bei TPS10-Mutanten beobachteten Anteil.

3 Ergebnisse

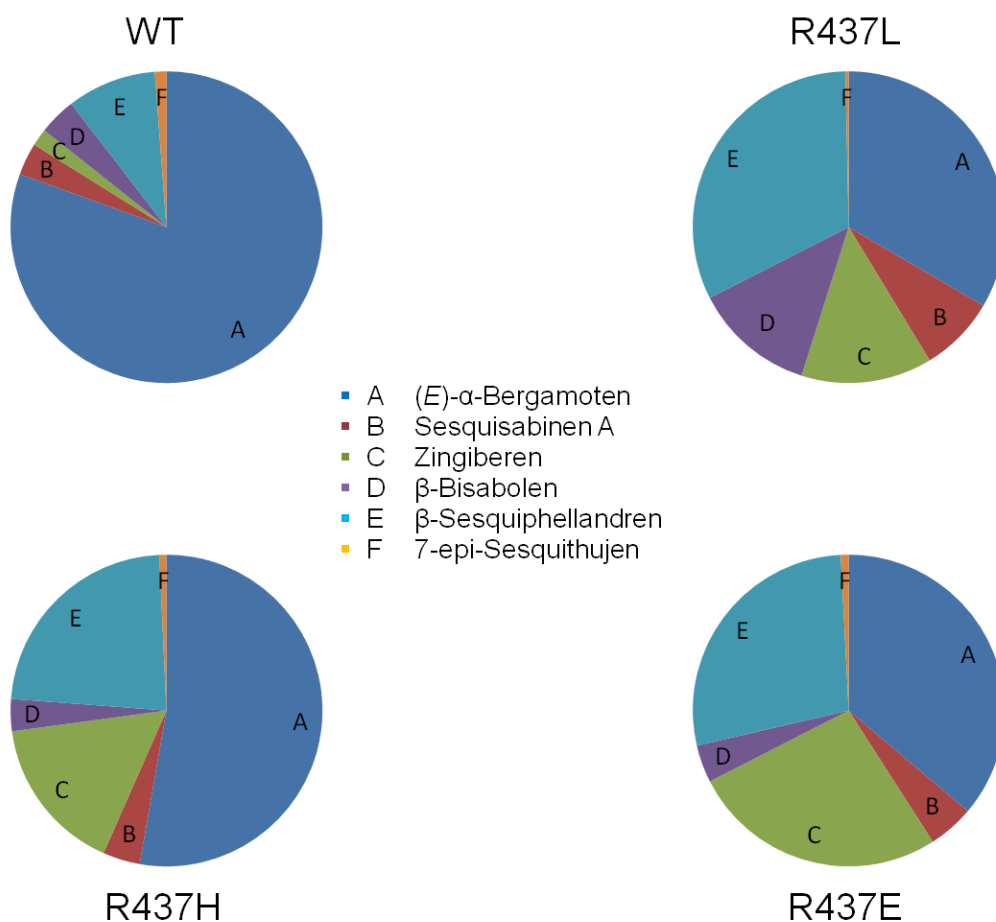


Abb. 39 Mutationen von R437 zeigen mit (Z,E)-FPP abhängig von der Mutation ein verändertes Terpenspektrum

Aufgrund der Inaktivität von R249- und R427-Mutanten bzw. Wildtypaktivität der R367-Mutante wurden diese nicht gesondert dargestellt. Die dargestellten Mutanten von R437 (n=3) wurden mit (Z,E)-FPP inkubiert, da die Isomerisierungsreaktion mit (E,E)-FPP eingeschränkt war. Die Reaktion und Chromatographie erfolgte standardisiert. Der Gehalt wurde mit Standardkurven bestimmt.

3.2.3.3 Deprotonierung

Den letzten Schritt in der Kaskade zur Bildung volatiler Terpene stellt die Deprotonierung dar. Dafür muss eine saure Aminosäure wie Glutaminsäure oder Asparaginsäure, welche bei physiologischen pH-Wert als Glutamat oder Aspartat vorliegen, in der Nähe des Carbokations liegen. Diese übernimmt kurzzeitig die positive Ladung und ein stabiles Terpen kann gebildet werden. Alternativ wurde anhand von Kristallstrukturen der Trichodiensynthese das abgespaltene Diphosphat als Protonenakzeptor diskutiert (Rynkiewicz et al. 2001). Diese Theorie wurde aufgrund von theoretischen Berechnungen als nicht wahrscheinlich betrachtet (Jindal and Sunoj). Nach Ausschleusung des Terpens aus dem aktiven Zentrum erfolgte die Regeneration des Protonenakzeptors. Wenn die Deprotonierung nicht möglich sein sollte, würde dies zur Inaktivität des Proteins oder zur Bildung von großen Mengen Terpenalkohol führen, wenn die reaktiven Intermediate Kontakt zu Wasser haben sollten. Welcher Protonenakzeptor in TPS10 vorliegt sollte in folgender Studie ermittelt werden.

3 Ergebnisse

Durch Betrachtung des aktiven Zentrums fiel ein Aspartat (D510) auf, welches daraufhin durch gerichtete Mutation in ein inertes Alanin verwandelt wurde. Durch Verwendung der Standardsubstrate konnte die Inaktivität der Mutante nachgewiesen werden (Abb. 40). Weiterführend wurde getestet ob schwefelhaltige Aminosäuren wie Cystein und Methionin in der Lage wären die Funktion als Protonenakzeptor anstelle des Aspartats zu übernehmen. Die Methionin-Mutanten zeigten aufgrund der weniger reaktiven Thioether-Gruppe weiterhin keine Aktivität. Durch Variation mit einem Cystein, welches durch die freie Thiol-Gruppe eine höhere Reaktivität besitzt, konnte eine geringe Aktivität wieder hergestellt werden. Dies zeigte die Fähigkeit der HS-Gruppe Protonen aufzunehmen. Die Isomerisierung war bei Verwendung von (*E,E*)-FPP stark eingeschränkt. Daher wurde das Verhältnis der zyklischen Terpene bei Verwendung von (*Z,E*)-FPP betrachtet. Die Auswertung ergab eine verstärkte Bildung von β -Sesquiphellandren (58 %), gefolgt von (*E*)- α -Bergamoten (18 %), Zingiberen (12 %) und einer leicht erhöhten Bildung von β -Bisabolen (6 %) und Sesquisabinen A (6 %). Die Veränderung des Anteils und die Verteilung der zyklischen Terpene bei der Mutante D510C, führe ich auf Positionsveränderungen des Substrats im aktiven Zentrum zurück. Sie zeigen einmal mehr die Empfindlichkeit des Systems.

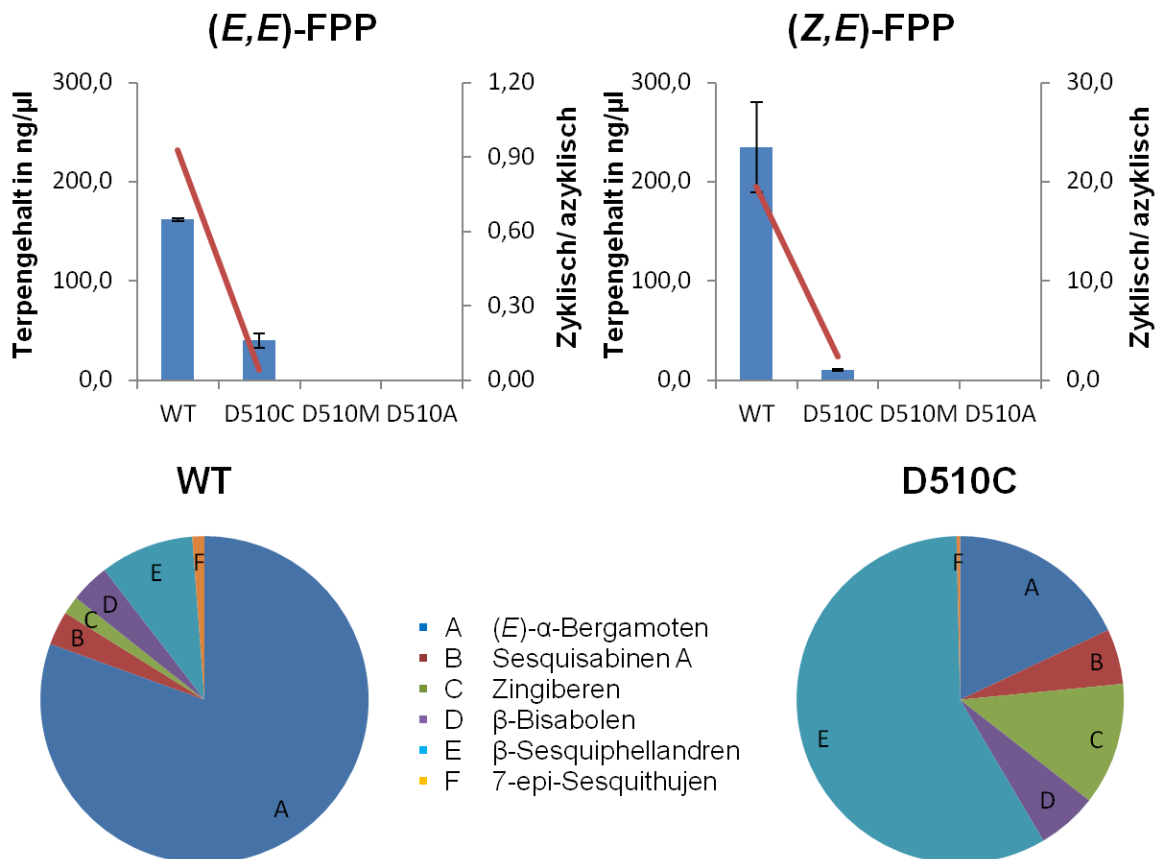


Abb. 40 Aspartat 510 als zentraler Protonenakzeptor im aktiven Zentrum

Den Abschluss der Reaktion von TPS10 stellt die Deprotonierung dar. Sie führt zur Bildung von Terpenen welche im Anschluss durch eine Konformationsänderung aus dem aktiven Zentrum ausgeschleust werden. Es wurde diskutiert ob die Deprotonierung über das vom Substrat abgespaltene Diphosphat oder Seitenketten von Aminosäuren (Aspartat, Glutamat) erfolgt. Durch Untersuchung des Homologiemodells von TPS10 wurde im aktiven Zentrum nur ein möglicher Protonenakzeptor (D510) gefunden. Daraufhin erfolgte ein Austausch des Aspartats mit einem schwachen Protonenakzeptor (D510C), dessen methylierte Form (D510M) und Alanin. Die Mutanten (n=3) wurden mit (*E,E*)-FPP und (*Z,E*)-FPP inkubiert. Der schwache Protonenakzeptor Cystein war noch reaktiv und wurde mit dem Wildtyp im Kreisdiagramm gegenübergestellt. Die Reaktion und Chromatographie erfolgte standardisiert. Der Gehalt wurde mit Standardkurven bestimmt.

3 Ergebnisse

3.2.3.4 Katalytische Kaskade

Aufgrund der Aktivität bei der D510C-Mutante, welche den einzig in Frage kommenden Protonenakzeptor im aktiven Zentrum blockierte, wurde die Beteiligung des Cysteins an Position 510 an einer katalytischen Kaskade vermutet. Das würde die Restaktivität erklären und sollte näher untersucht werden. Daher wurde im Umfeld von D510 nach potentiellen Protonenakzeptoren gesucht, welche für eine katalytische Kaskade in Frage kommen würden. Diese Protonenakzeptoren waren T509 und E508, welche alle auf der J-K-Schleife positioniert waren. Auf der J-K-Schleife sollte weiterführend D497 und T501 auf eine Beteiligung an einer katalytischen Kaskade untersucht werden.

Bei der Untersuchung des chemischen Umfelds im aktiven Zentrum fielen weitere potentielle Protonenakzeptoren gegenüber der J-K-Schleife auf. Diese waren D250, E254 und C255 und sind Bestandteil der ebenfalls flexiblen A-C-Schleife, wo auch die Arginine R249 und R251 liegen. Diese haben bekanntlich als Lewis-Säure einen stabilisierenden Einfluss auf den Substrat-OPP-Komplex, was die Abspaltung des Diphosphats ermöglicht (Starks, Back et al. 1997). Außerdem ruft das zweite Arginin (R251) wahrscheinlich eine Konformationsänderung der J-K-Schleife bzw. des N-terminalen Endes hervor und geht Wasserstoffbrückenbindungen mit diesen variablen Bereichen ein (Starks, Back et al. 1997). Daher gehe ich davon aus das D250, E254 und C255 die Ausbildung dieser Konformation oder die Abspaltung des Diphosphats unterstützen, weil sie bei den Dockinguntersuchungen am Homologiemodell große Entfernungen zu den Deprotonierungsstellen aufwiesen. Sie wurden daher nur zur Vollständigkeit erwähnt.

Der Austausch der untersuchten Aminosäuren erfolgte unter Beachtung ihrer räumlichen Größe und Form zur Ausgangsaminosäure. Unter dieser Maßgabe wurden diese AS durch ähnliche unpolare, hydrophobe AS wie Leucin und Alanin ausgetauscht. Es wurde auch versucht für die katalytische Kaskade relevante funktionelle Gruppen durch andere zu ersetzen (C255D) und die räumliche Position der funktionellen Gruppe (E254D) und die Auswirkung auf die katalytische Kaskade zu untersuchen (Abb. 41).

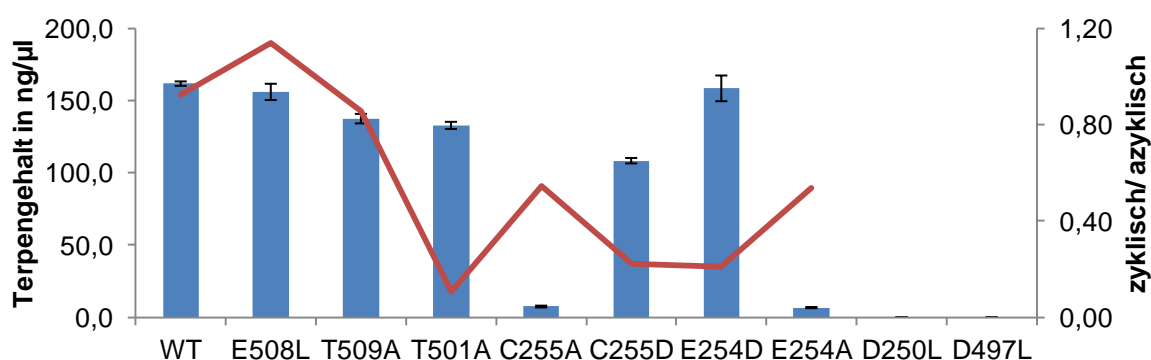


Abb. 41 Untersuchungen zur katalytische Kaskade der Deprotonierung

Die multiplen Terpenprodukte bedingen Deprotonierungsreaktionen an verschiedenen Positionen des Substrats. Um eine Deprotonierung der unterschiedlichen Terpene zu gewährleisten ist entweder eine Drehung in Richtung des Protonenakzeptors oder eine Weiterleitung des Protons entlang einer katalytischen Kaskade notwendig. Durch Analyse des aktiven Zentrums wurden potentielle Positionen für eine intakte Kaskade identifiziert und mutiert. Die dargestellten Mutanten (n=3) wurden mit (E,E)-FPP inkubiert. Die Reaktion und Chromatographie erfolgte standardisiert. Der Gehalt wurde mit Standardkurven bestimmt.

3 Ergebnisse

Die Aminosäuren der A-C-Schleife (D250, C255, E254) und ihr potentieller Reaktionspartner auf der J-K-Schleife (D497) zeigten nach der Mutation zu Leucin oder Alanin Inaktivität oder stark verringerte Aktivität. Erhält man jedoch durch den Austausch mit entsprechenden AS (E254D, C255D) die Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen auszubilden, so bleibt die Aktivität mit einer verringerten Bildung von zyklischen Produkten erhalten. Dies spricht für die Rolle dieser AS für die Ausbildung der Konformationsänderung bzw. Bindung des N-Terminus, da sie laut Homologiemodell nicht an Interaktionen mit Intermediaten beteiligt sind. Ich möchte aber einen Einfluss auf gegebenenfalls vorhandene Deprotonierungssysteme oder katalytische Kaskaden nicht ausschließen, da genaue Betrachtungen aufgrund der nicht vorhandenen Aufnahmen von Kristallstrukturen von TPS10 nicht möglich sind. Die Mutationen der AS E508, T509 und T501 zeigen keinerlei Aktivitätsverlust. Lediglich die Mutation T501A zeigt eine verringerte Bildung von zyklischen Produkten. Daher gehe ich nicht von einem Effekt auf die Deprotonierung aus. Der Rückgang der Bildung zyklischer Terpene könnte auf einen Effekt auf die Ausbildung einer anderen Konformation zurückgeführt werden.

Zusätzlich zu den oben genannten Mutationen wurden Methionin-Varianten (M505A, C, L) erzeugt, welche ebenfalls einen Teil der potentiellen katalytischen Kaskade im Bereich der J-K-Schleife darstellen. Die Veränderungen am M505 zeigten mit Ausnahme der Leucin-Mutante bei der Reaktion mit (*E,E*)-FPP eine starke Einschränkung der Isomerisierungsreaktion, es wurde also vorrangig (*E*)- β -Farnesen gebildet. Um den Einfluss der veränderten Isomerisierung auszuschließen, wurden alle Mutanten mit (*Z,E*)-FPP inkubiert. Die gebildeten Mengen an Terpenen reichten aus, um einen Vergleich der Produktverhältnisse durchführen zu können (Abb. 42). Der Einschränkung bei der Isomerisierungsreaktion folgend unterschieden sich M505A und M505C hinsichtlich der Bildung von zyklischen Terpenen bei Inkubation mit (*Z,E*)-FPP. (*E*)- α -Bergamoten war bei diesen Mutanten zwar noch Hauptprodukt (M505C 45 %, M505A 41 %), wurde aber von einem hohen β -Bisabolen Anteil begleitet (M505C 39 %, M505A 34 %). β -Sesquiphellandren war bei beiden Mutanten gegenüber dem Wildtyp (9 %) verringert (M505C 6 %, 8%). Zingiberen und 7-*epi*-Sesquithujen blieben auf dem Niveau des Wildtyps. Bei Sesquisabinen A erfolgte bei beiden Mutanten eine Erhöhung des Anteils (M505C 6 %, M505A 12 %) (Abb.43). Aufgrund der Aktivität aller Mutanten von M505 schließe ich einen Einfluss auf die Deprotonierung aus und gehe von einer konformationsbeeinflussenden Wirkung aus.

3 Ergebnisse

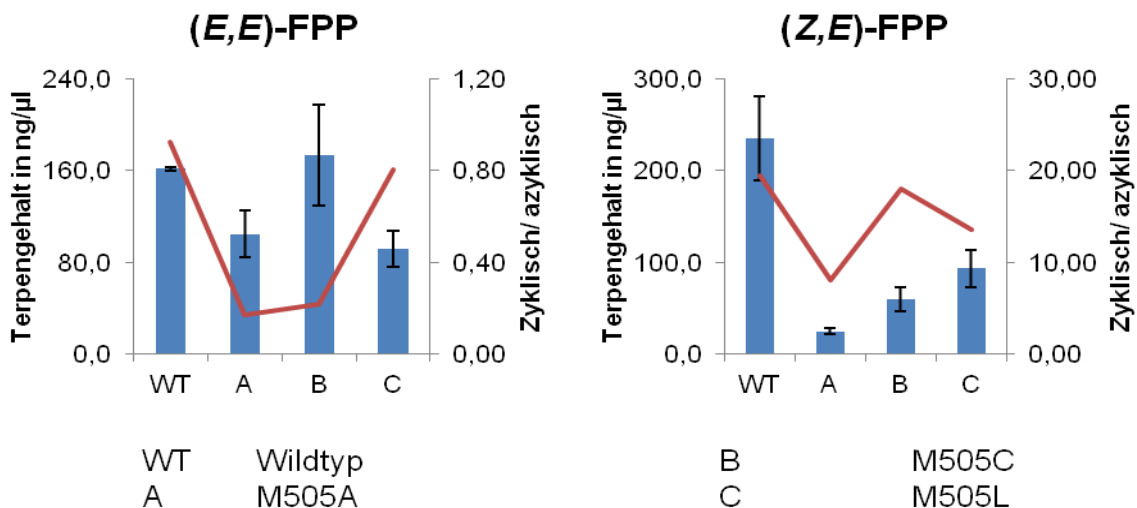


Abb. 42 Methionin 505 als Teil der J-K-Schleife verstärkt die Stabilisierung des Bisabolyrcarbokations

Durch eine Konformationsänderung während der Aufnahme des Substrats ins aktive Zentrum von TPS10, beginnt mit der Abspaltung des Diphosphats der Reaktionsmechanismus. Dies betrifft die A-C-Schleife, die J-K-Schleife und der frei bewegliche Teil des N-terminalen Endes. Das Methionin hat durch seine Position auf der J-K-Schleife einen Einfluss auf die Stabilisierung der Carbokation-Intermediate. Aufgrund der Mutation mit Alanin und Leucin welche über nicht reaktive Seitenketten verfügen, wird eine Funktion als Teil einer katalytischen Kaskade ausgeschlossen. Die sterischen Unterschiede von Alanin und Leucin führten aber zu einer veränderten Isomerisierungsreaktion zwischen beiden Mutanten. Die Mutanten (n=3) wurden mit den Substraten (E,E)-FPP, welches als natürliches Substrat einer Isomerisierungsreaktion zur nachfolgenden Reaktion zu zyklischen Produkten unterlag, und (Z,E)-FPP standardisiert inkubiert. Letzteres diente bei Einschränkung der Isomerisierung der Aufklärung zyklischer Produktionsverhältnisse. Die Auftrennung erfolgte mittels GC/MS und die Gehaltsbestimmung mit Standardkurven.

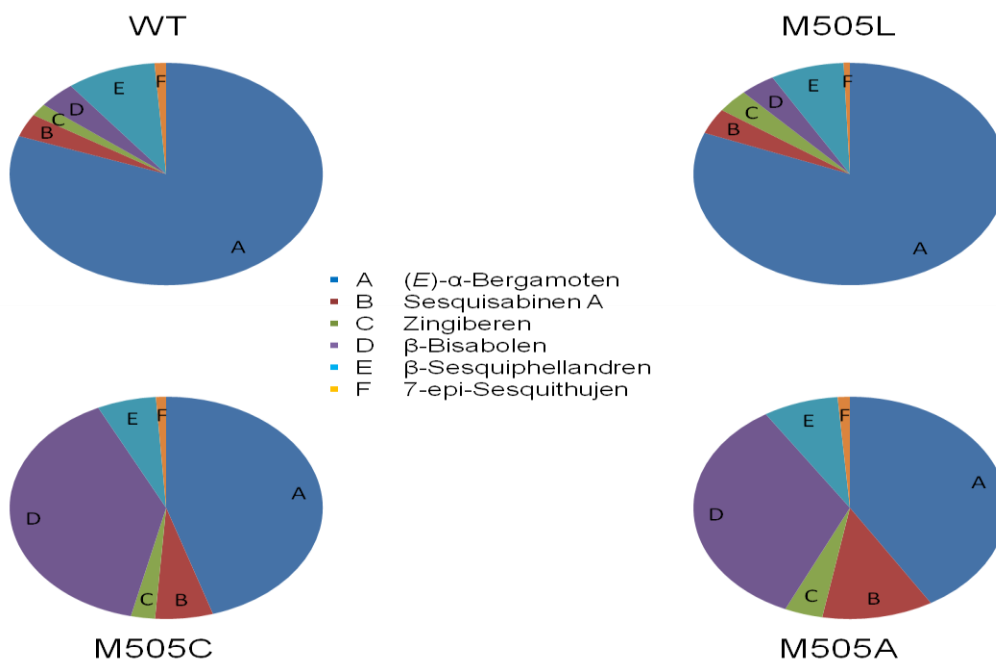


Abb. 43 Produktionsverhältnis der zyklischen Terpene in Methioninmutanten von TPS10

Die Untersuchung des chemischen Umfelds des aktiven Zentrums im Homologiemodell zeigte die Beteiligung der Aminosäuren der J-K-Schleife an der Ausbildung des aktiven Zentrums. Bei der Überprüfung interessanter Aminosäuren fiel die veränderte Produktbildung bei Mutationen an Position 505 besonders auf. Eine Verringerung der Isomerisierung bei der Mutation mit Alanin und Cystein zeigte bei der Reaktion mit (Z,E)-FPP im Vergleich zum Wildtyp und der Mutation mit Leucin eine verstärkte Bildung von β -Bisabolen. Die Auftrennung und Identifizierung der Terpene wurde mittels GC/MS umgesetzt. Der Gehalt wurde anhand von Standardkurven bestimmt.

3 Ergebnisse

3.3 Untersuchungen zum Einfluss der Domänen auf die Funktion von TPS10

TPS10 ist ein Enzym welches aus α -Helices aufgebaut ist und aus zwei Domänen besteht. Diese Domänen werden N-terminale und C-terminale Domäne genannt. Die C-terminale Domäne von Sesquiterpensynthasen beginnt mit einer markant langen α -Helix A (Starks, Back et al. 1997). In TPS10 beginnt dies mit der Glutaminsäure208 und endet bei Leucin532. Diese Domäne trägt das aktive Zentrum. Die Funktion der N-terminale Domäne sollte aufgeklärt werden. Dazu wurden die Domänen getrennt voneinander in pASK-IBA-33⁺ und 37⁺ kloniert und überexprimiert. Die Reaktion mit (*E,E*)-FPP ergab mit allen Mutanten eine Terpenbildung unterhalb der Ausschlussgrenze der AUC von 50Tsd. relativen Einheiten. Damit galten sie als nicht aktiv (Abb.3.3). Daraus ergab sich die Frage ob die N-terminale Domäne eventuell als Faltungshelfer diene, welche funktionsgebend wäre. Eine Mischung der partiell gereinigten Proteinextrakte beider Domänen wurde im Verhältnis 1:1 gemischt, um herauszufinden ob sich dadurch eine Funktion des Proteins erreichen lässt. Nach standardisierter Inkubation stellte man Inaktivität fest.

Aufgrund der Vorversuche sollte eine Co-Expression versucht werden. Durch *in situ* Expression in einer *E.coli* Zelle sollten sich die Domänen direkt nach ihrer Bildung in einer räumlichen Nähe befinden, welche die Anlagerung aneinander ermöglichen sollte. In Vorbereitung wurde mit pBad33 ein kompatibler Vektor für eine Co-Expression gefunden, welcher allerdings weniger Kopien pro Zelle hatte als der bisher genutzte pASK-IBA33⁺ bzw. -IBA37⁺. Dies würde zu weniger Protein und damit zu einer geringeren Terpenbildung führen. Die Klonierung der Domänen und des TPS10 Gesamtproteins erfolgte in pBad33, wobei das Gesamtprotein als Vergleich zur bisherigen pASK-IBA-Überexpression genutzt wurde. Dies war erwartungsgemäß mit einer AUC von nur 255 Tsd. relativen Einheiten deutlich geringer (Abb.3.3), zeigte aber das normale Terpenspektrum. Lediglich die Produkte Sesquisabinen A und 7-*epi*-Sesquithujen konnten aufgrund ihrer sehr geringen Bildung nicht eindeutig identifiziert werden. Die Erzeugung von *E.coli*-Klonen welche beide Domänen trugen beschränkte sich aufgrund der schwierigen Klonierung auf die Variante mit der N-terminalen Domäne in pBad33 und der C-terminalen Domäne auf pASK-IBA-37⁺. Die geplante Klonierung der C-terminalen Domäne in pBAD blieb nach verschiedenen Versuchen erfolglos (siehe unten). Erfreulicherweise konnte bei der Überexpression der vorliegenden Co-Expressionsmutante nach standardisierter Reaktion mit (*E,E*)-FPP eine Terpenbildung beobachtet werden (Abb.3.3), die sogar leicht oberhalb der TPS10 Überexpression in pBAD33 lag. Dies konnte als Bestätigung der Theorie genommen werden, dass N-terminale Domäne als Faltungshelfer fungiert. Zur weiteren Untersuchung sollten die *in situ* gebildeten Domänen in Kooperation mit der AG Prof. Sinz chemisch verknüpft werden. Dazu wurden 3l Kulturen erzeugt und standardisiert aufgereinigt. Eine maschinelle Aufreinigung des Proteins mittels UV-Detektor kontrollierter Nickelaffinitätschromatographie (Äkta, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) gelang nicht. Daher wurden die Proteinextrakte unter schonenden Bedingungen mit der Nickelaffinitätschromatographie aufgearbeitet. Die schwachen Bindungen zwischen den Domänen sollten dabei erhalten bleiben. Die Reinigung blieb erfolglos. Desweiteren wurde die bereits aktive *E.coli*-Doppelmutante erneut unter standardisierten Bedingungen überexprimiert und der partiell gereinigte Proteinextrakt mit (*E,E*)-FPP zur Reaktion gebracht. Eine Terpenbildung blieb aus. Mehrfache Wiederholung der Überexpression und der Reinigung führte im Laufe der Zeit zu sieben Expressionen

3 Ergebnisse

welche Terpene bildeten, wovon zwei das Niveau aus Abb. 44 erreichten. 34 Expressionen blieben erfolglos und zeigten die geringe Robustheit des Verfahrens.

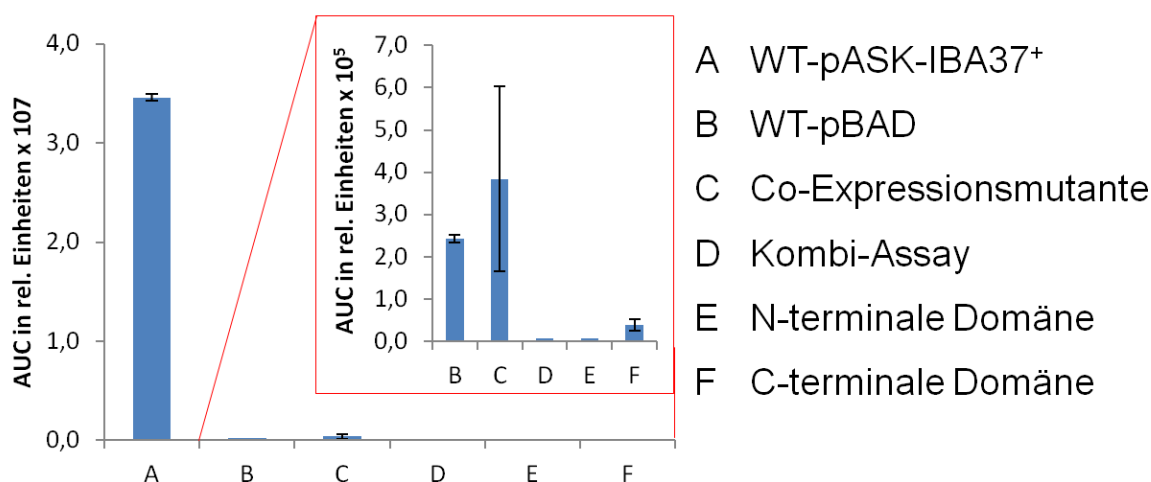


Abb. 44 Vergleich der Aktivität von separat exprimierten Domänen von TPS10 mit dem Gesamtprotein

Das aktive Zentrum von TPS10 liegt wie bei allen Klasse 1 Sesquiterpensynthasen in Pflanzen auf der C-terminalen Domäne. Die Aristolochensynthase aus *Aspergillus terreus* und *P. roquefortii* treten als Singeldomäne mit der typischen Faltung von Klasse 1 Terpensynthasen auf (Caruthers et al. 2000; Shishova et al. 2007). Daher stellt sich die Frage ob die C-terminale Domäne auch eigenständig Aktivität zeigt und welche Funktion die N-terminale Domäne ausfüllt. Die Beantwortung erforderte die separate Klonierung der Domänen und ihre Co-Expression in verschiedenen Vektorsystemen. Die Reaktion mit (*E,E*)-FPP wurde mit TPS10 Mutanten im Vektor pASK-IBA37⁺ (n=3) und pBAD33 (n=5) durchgeführt. Die Reaktion der Co-Expressionsmutante (n=2), der separaten Domänen und kombinierten N- und C-terminalen Domänen in IBA37⁺ (n=3) erfolgten ebenfalls unter standardisierten Bedingungen mit anschließender GC/MS. Auf die Berechnung des Gehalts wurde aufgrund der geringen oder nicht vorhandenen Terpenbildung der meisten Mutanten verzichtet und stattdessen die AUC in relativen Einheiten angegeben.

Um die Gesamtbildung von Terpenen zu erhöhen wurde ein Duet-Vektor-System verwendet, welches eine ähnliche Kopienzahl wie das pASK-IBA-Vektorsystem aufwies. Mit den zwei darin enthaltenen „Multiple cloning sites“ sollten beide Domänen auf einem Vektor parallel überexprimiert werden. Aufgrund der höheren Anzahl von Vektorkopien pro Zelle sollte mehr Protein und damit eine höhere Terpenbildung stattfinden.

Bis zuletzt blieb die Klonierung der Domänen in pBAD33 und pACYC-Duet-2 eine unüberwindbare Hürde. In unzähligen Anläufen wurden verschiedene Restriktasen verwendet, Puffersysteme variiert und versucht, mittels Zwischenklonierung in andere Vektorsysteme (TopoTA), die Klonierung zum Erfolg zu führen. Desweiteren wurde die Länge der Aminosäuresequenz der Domänen variiert. Die ursprüngliche N-terminale Domäne reichte von Methionin1 bis Leucin223. Folgend wurde die N-terminale Domäne auf α -Helix A an den Positionen N207, L220, L229 und L239 eingegrenzt.

4 Diskussion

4.1 Ein neues Modell der Isomerisierungsreaktion als Voraussetzung zur Bildung zyklischer Produkte

Im Verlauf des Reaktionsmechanismus von TPS10 ist es für die Vielfalt des Terpenspektrums erforderlich zu zyklisieren. Dafür muss bei Sesquiterpensynthesen das Substrat (*E,E*)-Farnesylpyrophosphat um die Achse C₂-C₃ zum (*Z,E*)-FPP rotieren. Allerdings ist die Rotation im Substrat durch die Doppelbindung C₂-C₃ nicht möglich. Nach Abspaltung des Diphosphats ergibt sich eine delokalisierte Ladung des Farnesylcarbocation an den Positionen C₁, C₂ und C₃ (Starks, Back et al. 1997). Dies würde eine Drehung ebenfalls verhindern, da durch die delokalisierte Ladung ein quasi Doppelbindungsstatus besteht. Gleiches gilt auch für die Umsetzung von Geranyldiphosphat bei Monoterpensynthesen oder Sesquiterpensynthesen mit Monoterpenaktivität. Das bisherige Modell geht daher von einer Rephosphatierung des Diphosphat an C₃ zum transoiden Nerolidyldiphosphat aus, um eine Isomerisierung bei Sesquiterpensynthesen zu erreichen (Cane et al. 1990; Köllner, Schnee et al. 2004; Köllner, Gershenzon et al. 2009). Monoterpensynthesen bilden analog zu den Sesquiterpensynthesen Linalyldiphosphat als präzyklisches Intermediat aus (Croteau et al. 1988; Cane, Pawlak et al. 1990; Williams, McGarvey et al. 1998; Köllner, Schnee et al. 2004; Köllner, Gershenzon et al. 2009). Durch die Isomerisierung eröffnet sich mit (*E,E*)-FPP für TPS10 die Möglichkeit der Ringbildung von C₁-C₆, bei anderen Terpensynthesen wurden C₁-C₁₀ und C₁-C₁₁ Zyklisierungen beschrieben. Nach der Zyklisierung ergeben sich vielfältige Optionen zur Bildung diverser zyklischer Sesquiterpene. Dies gilt auch für Monoterpensynthesen. Für die Monoterpenaktivität bei TPS10, also der Reaktion mit Geranyldiphosphat, resultiert es neben der Bildung des (*E*)- β -Farnesen-Analogons Myrcen in der Bildung des zyklischen Limonens.

Fütterung mit NDP zur Überprüfung der Rephosphatierung

Zur Überprüfung des Modells zur Isomerisierung wurde die Alabaflavononsynthese anstatt mit (*E,E*)-FPP mit transoiden und cisoiden Nerolidyldiphosphat inkubiert (Lin and Cane 2009). Bei Monoterpensynthesen wurde anhand der (+)- δ -Cadinensynthese aus *Gossypium arboreum* mit Neryldiphosphat, dem Analogon zu Nerolidyldiphosphat bei Monoterpensynthesen, inkubiert (Faraldos et al. 2012). Es konnte jeweils ein gleichartiger Umsatz des Substrats im Vergleich zu (*E,E*)-FPP gezeigt werden. Damit unterstützen diese Publikationen die These der Rephosphatierung im Zuge der Isomerisierungsreaktion. Es war allerdings bisher nicht möglich diese These eindeutig zu beweisen.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Fütterungsversuche von TPS10 mit (3*R*,6*D*)- und (3*S*,6*D*)-Nerolidyldiphosphat (NPP) blieben inaktiv. Dies ließ Zweifel an der bisher für TPS10, und darüber hinaus an Terpensynthesen im Allgemeinen, postulierten Theorie aufkommen, da das eingesetzte Substrat das Zwischenprodukt der postulierten Isomerisierung darstellte. Es hätte sich also problemlos in die Reaktionskaskade einreihen und eventuell eine Spezifität für zyklische oder azyklische Produkte zeigen sollen. Wahrscheinlich ist die Abspaltung des Diphosphats vom NPP in TPS10 nicht möglich, da die Energiebarriere (455kcal) laut Berechnungen von J.Szczesny sehr hoch ist (Szczeny 2011) und in TPS10 nicht ausreichend durch stabilisierende Komponenten gesenkt wird. Dies

4 Diskussion

würde jedoch bedeuten, dass bei den vorausgegangenen Untersuchungen ein Umsatz von NPP lediglich die Möglichkeit der Terpensynthesen zur Abspaltung des Diphosphats zeigt.

Abspaltung des OPP und Rephosphatierung (Arginine Me-Komplex)

Die Abspaltung des Diphosphat vom Substrat wird unter dem Einfluss von Wasserstoffbrückenbindungsdonatoren ermöglicht. Diese Funktion übernehmen bei TPS10 Arginine wie R247, R249, R437 und R427, welche in der Nähe des Eingangs zum aktiven Zentrum liegen und im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Bekannt ist in diesem Zusammenhang das bei Sesquiterpensynthesen ubiquitär vorkommende RxR-Motiv (Starks, Back et al. 1997). Diesem Motiv kommt eine Doppelfunktion zu. Zum einen bildet ein Arginin eine H-Brückenbindung zur Festigung einer bestimmten Konformation des Enzyms. Zum anderen erfolgt eine Bindung zum Diphosphat. Die Arginine schwächen durch ihre elektronenziehende Wirkung die Bindung des Diphosphats zum Farnesylrest was in Folge zur Abspaltung führt.

Ein weiterer Aspekt der die Abspaltung des Diphosphats begünstigt ist der Magnesium-Aspartat-Komplex. Die Anwesenheit der zweiwertigen Kationen senkt die Aktivierungsenergie (Brandt et al. 2009). Außerdem sind sie unverzichtbar in ihrer Funktion als Lewis-Säure für die Abspaltung des Diphosphats analog zu den Argininen (Brandt et al. 2009). Zusammenfassend lässt dies den Schluss zu, dass die benötigte Reaktionsenergie für die Abspaltung des Diphosphats mit steigender Anzahl komplexierender Gruppen, wie Metallionen und basischen Aminosäureresten, fällt. Bezogen auf TPS10 zeigt dies die hohe Komplexität der Chelatisierung, die durch kleinste Veränderungen in der Position des Enzym-Substrat-Komplexes gestört werden kann. Diese Positionsverschiebung oder ein Ausfall stabilisierender Aminosäuren durch Mutation, führt damit zu einer unzureichenden Senkung der Reaktionenthalpie der Diphosphatabspaltung. Daher wäre unter physiologischen Bedingungen diese Reaktion unmöglich. Die Inaktivierung durch den Verlust von z.B. R249, R427 oder des DDxD-Motiv belegt dies. Darüber hinaus zeigt die Mutation R427, dass über das RxR-Motiv von TPS10 (R249-X-R251) hinaus, weitere Aminosäuren die Abspaltung des Diphosphats beeinflussen. Nach der Abspaltung würden die Metallionen-Komplexe und Arginine das abgespaltene Diphosphat weiterhin komplexieren (Brandt, Bräuer et al. 2009). Daher ist das postulierte Wiederangreifen der Diphosphat-Gruppe an C₁ oder C₃ während der Rephosphatierung unwahrscheinlich. Dies lässt wiederum Zweifel am bisherigen Modell der Rephosphatierung aufkommen.

Das Arginin R437, welches in der Nähe des NSE-Motivs positioniert ist, stellt in der Reihe der relevanten Arginine (R247, R249, R427, R437) eine kleine Ausnahme dar. Ein Wegfall führt nicht wie bei den anderen Argininen zur Inaktivität. Allerdings war die Isomerisierung stark eingeschränkt, was für einen sterischen Effekt auf die Chelatisierung des OPP⁻ spricht. Generell lässt sich die Aussage treffen, dass durch eine Verkleinerung der Seitenketten an Position 437 zyklische Terpene in TPS10 unspezifischer gebildet werden. Durch Mutanten mit verringerter Basizität, erhöhter Azidität und einer hydrophoben Seitenkette wurden ähnliche Spektren bei der Reaktion mit (Z,E)-FPP erzielt. Mit einer Verkürzung der Position 437 nahm die Bildung von (E)- α -Bergamoten ab, weil wahrscheinlich mehr Raum zur Ausrichtung des Substratrestes an stabilisierenden Komponenten besteht.

4 Diskussion

Neue Theorie als Gegenmodell zur Rephosphatierung

Die oben genannten Erkenntnisse stellen die Theorie der Isomerisierung durch Rephosphatierung an C3 in Frage. Dem entgegengesetzt verbleibt das Diphosphat bis zur Freigabe des neu formierten Terpens im Bereich der Metallbindemotive und der Arginine in chelatisierter Form bestehen (Starks, Back et al. 1997). Die Anwesenheit des negativ geladenen Diphosphat hat weiterhin Einfluss als Gegenladung zum intermediären Carbokation und fokussiert wahrscheinlich die Bildung des Carbokations an Position C₁ oder C₂. Dadurch würde es nicht zur Ausbildung des delokalisierten Carbokations zwischen C₁, C₂ und C₃ kommen und eine Rephosphatierung an C₃ als Bedingung zur Isomerisierung wäre nicht länger gegeben (Abb. 45).

Dies steht im Gegensatz zur bisherigen Theorie und stellt meinerseits nur eine Vermutung dar. Meiner Meinung nach ist es jedoch nicht ausreichend von einer Beobachtung, wie der Bildung von Nerolidol bei TPS 1 in Mais (Schnee, Köllner et al. 2002) oder der Akzeptanz von NPP als Substrat, auf alle Terpensynthesen zu schlussfolgern das eine Rephosphatierung erfolgt. Letzteres wurde zumal in Versuchen für TPS10 widerlegt und die Berechnungen zur Rephosphatierung der AG W. Brandt lassen nicht auf eine Rephosphatierung schließen (Brandt, Braeuer et al. 2009) (persönliche Mitteilung J.Szczny). Wie empfindlich der Komplex zur Chelatisierung ist zeigen auch die Versuche mit gelabelten Substraten die wiederum zu Einschränkungen bei der Umsetzung führten (Lin and Cane 2009; Faraldos et al. 2012)

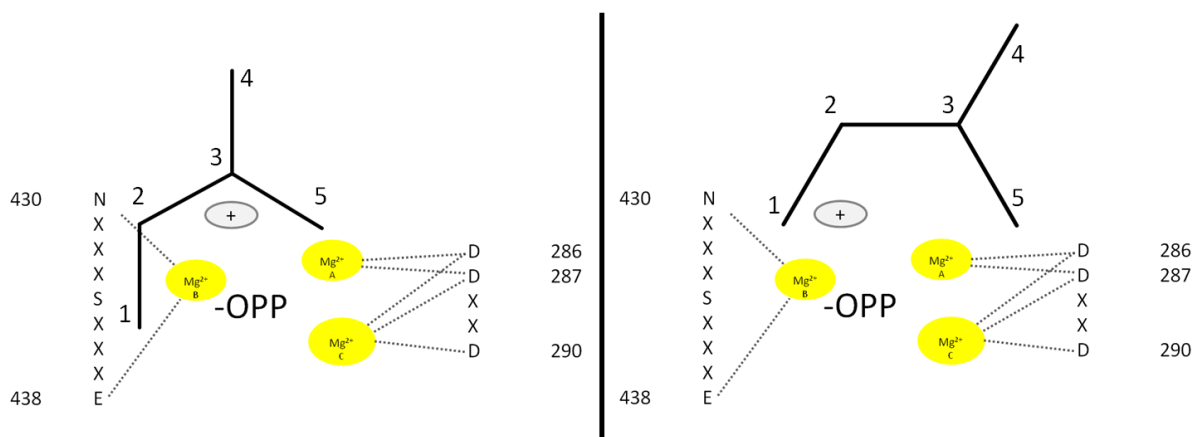


Abb. 45 Modell zur Isomerisierung bei Terpensynthesen

Nach der Abspaltung des Diphosphats kommt es zur Komplexierung durch zweiwertige Metallionen (Mg^{2+} , Mn^{2+}). Aufgrund von entstehenden Partialladungen wird das Carbokation fixiert. Durch Verschiebungen im Enzym-Substrat-Komplex kann dadurch die Isomerisierung verhindert oder verstärkt werden. Bei TPS10 kommt es durch Mutationen häufig zu Einschränkungen der Isomerisierung. Lediglich die Veränderung am C-terminalen Metallbindemotiv (N430D) führte zur Verstärkung der Isomerisierung bzw. zur vermehrten Bildung von zyklischen Terpenen. Das liegt wahrscheinlich an der veränderten Lage des Metallionbindekomplex, der zum einen die Rotation um die Achse C₂-C₃ erlaubt und gleichzeitig die Deprotonierung zum (*E*)- β -Farnesen verhindert.

Rückschlüsse aus der Thermodynamischen Betrachtung bezüglich des RM

Die Differenz der Standardbildungsenthalpien der Reaktionsprodukte von Deprotonierung und Isomerisierung bezüglich des Farnesylcarbokations (182 kcal) beträgt 168 kcal für die Deprotonierung zum (*E*)- β -Farnesen (15,5 kcal). Die Rephosphatierung welche zum transoiden Nerolidylphosphat (-275,5 kcal) führt zeigt eine Differenz von 458 kcal zum Farnesylcarbokation. Somit führt die Rephosphatierung zu einem deutlich stabileren Produkt

4 Diskussion

und sollte thermodynamisch begünstigt sein. Das Bildungsverhältnis zeigt aber eine annähernde Gleichverteilung der Bildung von zyklischen und azyklischen Terpenen. Daher kann man von einer kinetischen Kontrolle der Reaktion aufgrund enzymatischer Gegebenheiten ausgehen. Die Reaktionsgeschwindigkeit der Deprotonierung bei TPS10 wäre demnach höher als die der thermodynamisch begünstigten Rephosphatierung.

Die Rückreaktion der Isomerisierung ist allerdings stark eingeschränkt und führte zu einem Anteil von lediglich 4,5 % azyklischem Produkt. Da die Zyklisierung als Konkurrenzreaktion zur Isomerisierung zum stabileren zyklischen Bisabolyli-Kation führt, erklärt der thermodynamische Ansatz den geringen Anteil an azyklischen (*E*)- β -Farnesen bei Einsatz von (*Z,E*)-FPP und legt eine thermodynamische Kontrolle nahe.

Ausgehend von der kinetischen Kontrolle der Isomerisierung zeigen kleine Veränderungen im Stabilisierungs-/ Chelatisierungs-Komplex (Mg^{2+}_3 , Arginine) eine Verschiebung zu azyklischem (*E*)- β -Farnesen bei der Reaktion mit (*E,E*)-FPP. Die Isomerisierung ist damit eingeschränkt, da wahrscheinlich die Position der negativen Ladung des Diphosphats verändert wurde. Entweder ist das Diphosphat durch Mutation seiner Komplexpartner in der Position verändert oder die Lage des Farnesylkations ist aufgrund von Mutationen im Inneren des aktiven Zentrums verschoben. Aufgrund der Einschränkung der Isomerisierungsreaktion bei vielen im Verlauf dieser Arbeit erstellten Mutanten wurde, zur differenzierten Betrachtung des der zyklischen Produkte, das (*Z,E*)-FPP als Substrat genutzt.

Metallbindemotive in der Einordnung der Organismen und allgemeine Betrachtungen
Die übliche Betrachtung der pflanzlichen Terpensynthesen geht von der Kristallstruktur der epi-Aristolochen-Synthase aus *Nicotiana tabacum* aus (Starks, Back et al. 1997). Zheng stellte zwar im Vergleich zu bakteriellen und fungidalen Terpensynthesen größere Bindungsabstände im Bereich des trinukleären Magnesiumclusters fest (Zheng et al. 2008), was für eine teilweise geschlossene Konformation bei Substratbindung spricht (Aaron and Christianson 2010). Allerdings zeigen die Betrachtungen bezüglich der Komplexierung des Diphosphats in allen 3 Spezies gleiche Ergebnisse. So wird der Mg^{2+}_3 -Komplex erstmals 2001 aufgrund einer Röntgenkristallstruktur beobachtet (Rynkiewicz, Cane et al. 2001) und in Mg^{2+}_A , Mg^{2+}_B und Mg^{2+}_C unterteilt. Dabei wird Mg^{2+}_A und Mg^{2+}_C vom DDxxD-Motiv auf Helix D und Mg^{2+}_B vom NSE/ DTE-Motiv auf Helix H oktahedral gebunden. Bei Monoterpensynthesen wie der kristallisierten Bornylphosphatsynthase (Whittington et al. 2002) sieht die Chelatisierung ähnlich aus und wird für alle Terpensynthesen angenommen. Eine Veränderung um eine Methylgruppe vom Aspartat zum Glutamat hat solche starken Auswirkungen, dass die katalytische Aktivität in der Trichodien Synthase aus *Fusarium Sporotricioides* um das 22 fache abnimmt. Stärker wirkten sich allerdings Mutationen bei stabilisierenden Argininen aus. Dort nahm die katalytische Aktivität um das 5000 fache ab (Rynkiewicz et al. 2002; Vedula et al. 2005). Dies unterstreicht die Fragilität dieses Ionisations-Komplex. Aufgrund der zahlreichen Möglichkeiten der Ausprägung von Metallbindemotiven und ihren differenzierten Bindungsverhalten zum Metallionencluster, bei gleichbleibender Bindung des Metallclusters zum Diphosphat von FPP-Synthesen aus *E.coli* (Hosfield et al. 2004) zu Terpensynthesen wie der Bornylphosphatsynthase (Whittington, Wise et al. 2002), zeigt sich gleichzeitig auch die enorme Vielseitigkeit die sich aus der Evolution von unterschiedlichen Terpensynthesen ergibt. (Christianson 2006) geht dabei

4 Diskussion

noch weiter und stellt die Bindung des Magnesiumclusters als eine mögliche Evolutionsstrategie bei Terpensynthesen dar.

Abweichungen vom Standardmetallbindemotiv und Rückschlüsse aus dieser Arbeit

Allerdings sind auch Abweichungen von der Art der Motive möglich, welche an die Gegebenheiten des jeweiligen Enzyms angepasst und evolutionär bedingt sind. So wurde bei Sesquiterpensynthesen in unterschiedlichen Organismen verschiedene Motive auf Helix D entdeckt. Die Aristolochensynthese bei Pilzen wie *Penicillium roqueforti* und *Aspergillus terreus* bildeten anstatt eines DDxxD-Motiv ein DDxxE-Motiv aus (Caruthers, Kang et al. 2000; Shishova, Di Costanzo et al. 2007). Auf Helix H wurden bei diesen Organismen ein NSE-Motiv anstatt eines DTE-Motiv gefunden. Daraus folgte das Pflanzen auf Helix D aspartatreiche Motive in Form von DDxxD und auf Helix H DTE-Motive bilden. Pilze und Bakterien hingegen analog zu den pflanzlichen Terpensynthesen ein DDxxE und NSE-Motive bilden (Vedula, Jiang et al. 2008; Aaron and Christianson 2010). Die Untersuchung der veröffentlichten Sesquiterpensynthesen in Pflanzen konnte diese Aussage nicht bestätigen. Es zeigte sich eine breite Verteilung der möglichen Metallbindemotive auf Helix H. Diese reichten von einem zweiten DDxxD- oder DDxxE-Motiv hinzu Varianten des NSE und DTE –Motivs, wobei letztere den größeren Anteil bildeten. Diese Sesquiterpensynthesen bildeten eine Vielzahl von Produkten und es wurde geschaut, ob eine Korrelation zwischen Metallbindemotiv und Reaktionsmechanismus bestand. Die in TPS10 vorliegende Primärzyklisierung (1,6-Zyklisierung) konnte nicht mit dem NSE-Motiv assoziiert werden. So lag z.B. in *Zea mays* TPS11 und *Oryza sativa* eine 1-11-Zyklisierung vor (Cheng, Xiang et al. 2007; Köllner, Held et al. 2008). Eine eindeutige Korrelation zwischen Metallbindemotiv und Reaktionsmechanismus war also nicht möglich.

4.1.2 Untersuchungen der Metallbindemotive und ihrer Umgebung bei TPS10

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zum Metallbindemotiv zeigten aufgrund der daraus resultierenden Veränderungen am Metallionen-Bindungs-Komplex, dass Mutationen, analog zu Sesquiterpensynthesen in anderen Organismen (Rynkiewicz, Cane et al. 2002), zu großen Veränderungen bis hin zur Inaktivität führen können. Eine Einführung eines DDxxD-Motivs anstelle des NSE-Motiv auf Helix H in TPS10 scheiterte daher ebenso wie die Bildung eines NSE-Motiv auf Helix D anstelle des DDxxD. Die gleichzeitige Veränderung auf Helix D und H zeigte ebenfalls keine Aktivität. Man kann daher davon ausgehen das der für die Abspaltung des Diphosphats notwendige Komplex bestehend aus Argininen und trinukleären Magnesiumionen gestört ist. Damit ist eine Stabilisierung, also die Senkung der Reaktionsenergie für die Abspaltungsreaktion, nicht mehr gegeben. Anders betrachtet zeigen diese Ergebnisse die Wichtigkeit dieses funktionierenden Komplexes für die Abspaltung des Diphosphats vom Kohlenstoffgrundgerüst des Substrats und damit dem Start der Reaktionskaskade von ionisationsabhängigen Klasse 1 Terpensynthesen (Christianson 2006). Da nicht alle in TPS10 identifizierten Aminosäuren bei einem Austausch einen Einfluss auf den Reaktionsmechanismus haben, könnte man die Aminosäuren der Metallbindemotive und die umgebenden Arginine daher in systemrelevante und systemvariable Strukturbereiche unterteilen.

4 Diskussion

Systemrelevante Bereiche im Bereich des Aspartatreichen-Metallbindemotivs

Systemrelevante Bereiche sind obligat und führen bei einem Austausch der Aminosäure zur „Zerstörung“ des Diphosphat-Chelatkomplex, also zur Inaktivierung aufgrund unzureichender Stabilisierung der Ladung durch Arginine oder das Fehlen von chelatisierenden Aminosäuren. Durch Substitution mit Alanin im Bereich des DDxxD-Motivs oder der Arginine (Peters and Croteau 2002; Felicetti and Cane 2004) konnte die Inaktivierung gezeigt werden.

Bei TPS10 zählen zu systemrelevanten Bereichen neben den erwähnten Argininen (R249, R427) s.o., das zweite Aspartat (D287) im DDxxD-Motiv (Helix D). Ein Austausch der Arginine führt möglicherweise zur kompetitiven Hemmung des Enzyms, da das Substrat nicht abgespalten werden kann und damit das Enzym blockiert oder es wird aufgrund der nicht erfolgten Abspaltung nicht umgesetzt. Die Metallbindemotive wirken indirekt auf die Abspaltung des Diphosphats, da die obligaten zweiwertigen Kationen (Mg_3^{2+}) nicht mehr durch die Seitenketten der Aminosäuren chelatisiert werden (Abb. 45). Dem mittleren Aspartat D287 kommt anscheinend dabei in TPS10 die wichtigste Rolle für die Fixierung von Mg_A^{2+} und Mg_C^{2+} zu, da Mutationen an dieser Position nicht toleriert werden. Dies ist aber bei der Betrachtung aller bisher untersuchten Terpensynthasen nicht immer gleich. Zum Beispiel sind im DDxxD-Motiv der Aristolochensynthase D301 und D305 direkt an der Bindung von jeweils einem Metallion beteiligt. D302, das Analogon von D287 in TPS10, war in der untersuchten Aristolochensynthase nicht direkt an der Bindung von einem Metallion beteiligt (Starks, Back et al. 1997).

Darüber hinaus gibt es weitere Beispiele für eine ähnliche aber nicht identische Bindung des trinukleären Magnesiumkomplexes, welche die feinen Unterschiede in jedem System belegen und somit eine Evolutionsstrategie zur Bildung verschiedener Terpene darstellt (Christianson 2006). Die Kristallstruktur der Trichodiensynthase aus *Fusarium sporotrichioides* (Rynkiewicz, Cane et al. 2001) zeigt die Bindung des ersten Aspartats vom DDxxD-Motiv zu Mg_A^{2+} und Mg_C^{2+} . Das stellt soweit keine Besonderheit bei den Terpensynthasen dar, da die Analoga des ersten Aspartats des DDxxD-Motivs zum Beispiel auch bei der (+)-Bornyldiphosphatsynthase aus *Salvia officinalis* (Whittington, Wise et al. 2002), der Farnesyldiphosphatsynthase und der epi-Aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* (Starks, Back et al. 1997) Mg_A^{2+} und Mg_C^{2+} binden. Im Gegensatz zu den anderen Beispielen sind bei der Aristolochensynthase die anderen Aspartate nicht an der Bindung des Mg_3^{2+} beteiligt. Leider liegen nicht von allen Enzymen Röntgenkristallstrukturanalysen mit dem komplexierten Metallionen vor. Ein Beispiel ist die kristallisierte Pentalensynthase aus *Streptomyces* UC5319 (Lesburg, Lloyd et al. 1995). Man versuchte hier über den Austausch der Aspartate einen Zusammenhang zur Bindung der Magnesiumionen zu gelangen. Die beiden ersten Aspartate (D80, D81) zeigten eine Reduktion der Aktivität, ein Austausch von D83 hatte dagegen einen schwachen reduzierenden Effekt auf die Aktivität (Seemann et al. 2002). Bei der Trichodiensynthase wurde durch einen ähnlichen Versuch (Cane et al. 1996) eine Reduktion der Aktivität beim Austausch von magnesiumbindenden Aspartaten gezeigt. Daher kann man bei D80 und D81 der Pentalensynthase auf eine Bindung zu zwei Magnesiumionen analog zur Trichodiensynthase ausgehen. Weiterführend fasst (Aaron and Christianson 2010) in ihrer Diskussion allgemein zusammen, dass Terpensynthasen aus Bakterien und Pilzen zur Bindung von Mg_A^{2+} und Mg_C^{2+} das erste Aspartat des DDxxD-Motivs benutzen, Pflanzen dagegen immer das erste und letzte Aspartat. Diese Aussage würde die Erstellung von Kristallstrukturen zu diesem Thema obsolet machen. Bezogen auf TPS10, wo der Austausch eines Aspartats durch Leucin

4 Diskussion

unabhängig voneinander zur Inaktivität führt, steht die Aussage von Aaron dazu im Gegensatz und ich denke, alle Aspartate bei TPS10 sind an der Chelatisierung der Magnesiumionen beteiligt. Differenzierter stellt sich das Bild dar wenn nur die Position der funktionellen Gruppe in Form des Austauschs vom Aspartat zum Asparagin betrachtet wird. Ein Austausch des ersten Aspartats (D286) wird besser toleriert und beeinflusst lediglich die Isomerisierung. Im Vergleich dazu wird die Mutation D287N nicht toleriert und führt zur Inaktivität der Mutante.

Systemrelevante Bereiche des NSE-Motivs

Das zweite Metallbindemotiv in Terpensynthasen auf α -Helix H liegt am häufigsten in der Form (D,N)Dxx(S,T,G)xxxE vor, d.h. als NSE-Motiv oder DTE-Motiv. Es ist verantwortlich für die Chelatisierung des Mg_B^{2+} aus dem trinukleären Magnesiumkomplex. (Peters and Croteau 2002) zeigten anhand der Abietadiensynthese aus *Abies grandis* mit einem gezielten Austausch der für die Chelatisierung wichtigen Aminosäuren im dort vorliegenden NTE-Motiv durch Alanin, eine Senkung der Aktivität und eine Veränderung der Produktbildung. Die Mutation N765A zeigte dabei nahezu Inaktivität. Der aktivitätsmindernde Effekt von T769A und E773A fiel im Vergleich dazu etwas geringer aus. Im analogen NSE-Motiv von TPS10 zeigt der Austausch von N430 ebenfalls im Vergleich zu den beiden anderen Positionen den größten Effekt. So ist der Austausch N430A fast inaktiv. Leucin-Mutanten bei der TPS4 (N452L) aus Mais (Köllner, O'Maille et al. 2006) und der Aristolochensynthese (N244L) (Felicetti and Cane 2004) führte die Mutation des analogen Asparagins sogar zur Inaktivität.

Variable Bereiche der Metallbindemotive/ Strukturen (Arginine)

Den systemrelevanten Strukturbereichen stehen in TPS10 variable Bereiche z.B. R437, S434 gegenüber, welche bei einer Mutation in keinem beobachteten Fall zur Inaktivität, dafür aber zur Veränderung in der Terpenbildung führen. Diese Veränderung in der Terpenbildung wurde neben einer Reduzierung der Aktivität auch bei Untersuchungen von (Peters and Croteau 2002) an der Abietadiensynthese beobachtet und durch (Zhou and Peters 2009) bestätigt.

Weiterhin gibt es Strukturelemente die bei einem Austausch mit zum Beispiel lipophilen Aminosäure wie Alanin oder Leucin und den damit verbundenen Verlust funktioneller Gruppen wie Amin-oder Carboxyl-Funktionen den Chelatkomplex zerstören. Der Tausch der funktionellen Gruppe wird dagegen gut toleriert, obwohl leichte sterische Veränderungen am Ionisationskomplex entstehen. Dazu zählt bei TPS10 das Asparagin (N430) im NSE-Motiv auf α -Helix H. Wie die Analoga in TPS4 (N452) (Köllner, O'Maille et al. 2006) und der Aristolochensynthese (N244) (Felicetti and Cane 2004) sind sie als Teil des zweiten Metallbindemotivs an der Chelatisierung des Mg_B^{2+} beteiligt. Ein Austausch mit Leucin oder Alanin führt bei allen genannten Beispielen zu einer Inaktivität, hingegen werden Aspartate anstelle des Asparagins akzeptiert.

Bei der Mutante N430D aus TPS10 führte die veränderte funktionelle Gruppe in diesem Fall zu einem überraschenden Ergebnis. Bis dahin konnte bei vielen Mutanten von TPS10 lediglich die Einschränkung der Isomerisierung, also der Drehung um die Achse C₂-C₃, gezeigt werden. Das führte zu einer Reduzierung der Bildung zyklischer Produkte. Ein Aspartat am Anfang des C-terminalen Metallbindemotivs kehrte diesen Effekt um, so dass fast ausschließlich zyklische Terpene gebildet wurden. Die Auswertung der Veröffentlichung von TPS4 (Köllner, O'Maille et al. 2006) zeigt wahrscheinlich ein ähnliches Verhalten bei der

4 Diskussion

Mutation von N452D. Allerdings wurde der Fokus bei Köllner 2006 auf einen Protonierungskomplex der epi-Aristolochensynthase der zur Bildung von Germacren A führt (Starks, Back et al. 1997) gelegt. Bei TPS10 führte die Mutation wahrscheinlich zur Verschiebung der Position des chelatisierten Diphosphat und erzeugte in der Reaktion mit (*E,E*)-FPP die 8 fache Menge an zyklischen Terpenen unter Beibehaltung der spezifischen Verteilung der zyklischen Terpene. Die Wichtigkeit für den Chelatkomplex zeigt hingegen ein Austausch mit Alanin an der gleichen Position, wo durch Wegfall der funktionellen Gruppe das Enzym fast inaktiv wurde. Nebenbei gesagt bedeutet die Mutation N430D in TPS10 die Einführung des von Vedula proklamierten pflanzlichen DSE-Motiv auf Helix H anstelle des bakteriellen und fungidalen NSE-Motivs (Cane and Kang 2000; Vedula, Jiang et al. 2008). Dieses wurde durch eine Doppelmutante später zum DTE-Motiv mutiert, welche aktiv war. Zuvor hatte Vedula das C-terminale Metallbindemotiv der Trichodiensynthase untersucht. Dieses lag in Form eines NSE-Motivs vor, welches er zum DTE-Motiv mutierte. Die Einzelmutanten N225D und S229T zeigten eine Verringerung der Aktivität. Die Doppelmutante (DTE-Motiv) war im Gegensatz zur analogen TPS10-Mutante inaktiv.

Wie erklärt sich die Variabilität von S434?

Bei der Abietadien-Synthase, einer Diterpensynthase, wurden die konservierten strukturelevanten Bereiche untersucht. Diese Aminosäuren wurden durch Mutation mit Alanin ausgetauscht und ihre Aktivität betrachtet (Peters and Croteau 2002). Dabei traten große Unterschiede in der Aktivität auf und bestätigen die bei TPS10 gemachten Beobachtungen von unterschiedlich wichtigen Aminosäuren (Arginine, Metallbindemotive) für die Chelatisierung des Diphosphat. Auffallend war die geringere Abnahme der Aktivität bei Mutationen der Motivmitte des NSE-Motivs in TPS10. Daraufhin konnte bei der Abietadiensynthase gezeigt werden, dass ein Austausch des Threonins durch Serin oder Glycin zu einer leichten Aktivitätsminderung führt, welche im Vergleich zum Aktivitätsverlust der Alanin-Mutante sehr gering ausfiel (Zhou and Peters 2009). Als Begründung wurde die stabilisierende Funktion der OH-Gruppe des Serins auf den Chelat-Komplex um Mg_B^{2+} angeführt. Die Aktivität der Glycin-Mutante wurde mit einem Wassermolekül erklärt, welches die Funktion eines Platzhalters und Wasserstoffbrückenbindungsbildner analog zur OH-Gruppe übernahm. Diese Theorie würde für das verbreitete Vorkommen von Glycin neben Serin und Threonin im sekundären Metallbindemotiv (α -Helix H) bei Mono-, Sesqui- und Diterpensynthasen sprechen. Beispiele für Sesquiterpensynthasen sind die Germacren A-Synthase aus *Lavandula angustifolia* oder die (*E*)- α -Bergamoten-Synthase aus *Lycopersicon esculentum* (van der Hoeven et al. 2000; Landmann et al. 2007).

Daraufhin wurden Variationen in der Mitte des NSE-Motivs bei TPS10 eingeführt. Die Inaktivierung durch den Austausch mit Alanin konnte nicht festgestellt werden. Interessant war in diesem Zusammenhang das freie SH-Gruppen (S434C) ebenfalls akzeptiert wurden. Wahrscheinlich ist die Einlagerung eines Wassermoleküls als Platzhalter bei TPS10 an Position 434 obligat. Dies würde einerseits die vergleichbare Menge an gebildeten Terpenen der Mutanten erklären und andererseits die verschiedenen Produktspektren der Serin- und Threonin-Mutanten gegenüber der Glycin-, Alanin- und Cystein-Mutante verdeutlichen. Beide Gruppen zeigen jeweils ein bestimmtes Terpenbildungsmuster, welches wahrscheinlich durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zu Mg_B^{2+} zustande kommt. Der Austausch mit dem räumlich größeren Threonin zeigte sogar eine etwas verstärkte Bildung von „kompakten“ (*E*)- α -Bergamoten. Man könnte daher annehmen, dass weniger Raum im

4 Diskussion

aktiven Zentrum zu kompakteren Produkten führt. Diese Idee wird bei der Betrachtung des aktiven Zentrums am Beispiel von W258 wieder aufgegriffen (s. Kap. 4.2).

4.2 Stabilisierung innerhalb eines kompakten Raums führt zum enzymatischen Zwang zur Zyklisierung am Beispiel W258

Terpensynthasen sind häufig Multiproduktenzyme d.h. sie bilden aus einem Substrat viele Produkte. Diese Eigenschaft beruht unter anderem auf der Fähigkeit positive Ladungen an unterschiedlichen Positionen des Substrats nach Abspaltung des Diphosphats zu stabilisieren. Dazu muß man sich den Enzym-Substrat-Komplex dynamisch vorstellen, d.h. es besteht die Möglichkeit, dass sich verschiedene Konformationen des Substrats in der Bindetasche bilden. Die einfachste Möglichkeit ein Terpen zu bilden ist die direkte Deprotonierung des nicht zyklischen Carbokations. Bei der Sesquiterpensynthase TPS10 entsteht dadurch aus (*E,E*)-FPP (*E*)- β -Farnesen (Schnee, Köllner et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass diese einfachen Deprotonierungen bei anderen Substraten ebenfalls gut funktionieren. So entsteht mit GPP hauptsächlich β -Myrcen und mit (*Z,Z*)-FPP (*Z*)- β -Farnesen. Bei TPS1 (Schnee, Köllner et al. 2002) fiel der Umsatz von GPP im Vergleich zum FPP unter gesättigten Bedingungen 4fach geringer aus, was die GC-Daten zu TPS10 bestätigen

Durch eine oder mehrere Ringbildungen werden weitere Möglichkeiten für das Enzym erschlossen. Bei TPS10 können dadurch 6 weitere Terpene gebildet werden (Köllner, Gershenzon et al. 2009). Bei TPS4 (Köllner, O'Maille et al. 2006) wurden 14 zusätzliche Terpene, bei der δ -Selinensynthase 34 und der γ -Humulensynthase, beide aus *Abies grandis* (Little and Croteau 2002), sogar 54 Terpene gefunden. Nun ist es erforderlich diese Intermediate zu stabilisieren. Geschieht dies an einer bestimmten Position liegt ein spezifisches Enzym vor. Können dagegen mehrere Intermediate stabilisiert werden entstehen viele Produkte. Je nach Aufbau des Enzyms führt die Möglichkeit zur Deprotonierung der Intermediate zur besagten Vielfalt im Produktspektrum. (s. Kap. 4.3)

Die Stabilisierung der Carbokationen erfolgt bei Terpensynthasen im lipophilen Kern des aktiven Zentrums. Dieser besteht aus Aminosäuren mit aliphatischen und aromatischen Seitenketten. Die aromatischen Aminosäuren verfügen nun über die Fähigkeit die reaktiven carbokationischen Intermediate über C^+ - π -Interaktionen zu stabilisieren (Dougherty 1996). Die epi-Aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* (Starks, Back et al. 1997) stellt hier das erste Modell dar. Hier dient W273 zur Fixierung der positiven Ladung und weiterführend sogar kurzzeitig als Protonakzeptor unter Entstehung eines Areniumionsim Indolring des Tryptophans (Biswas and Jackson 1989). Bei der Aristolochensynthase (Caruthers, Kang et al. 2000) stabilisiert das Tryptophan (W334) ein Eudesmancarbokation (Deligeorgopoulou et al. 2003). Diese Strukturen wurden analog auch bei der (+)-Bornyldiphosphatsynthase (F578, W323) und der Oxidosqualensynthase (Thoma et al. 2004) identifiziert und liegen somit ubiquitär bei allen Terpensynthaseklassen vor. Weitere Beispiele für wichtige Interaktionen von aromatischen Aminosäureseitenketten im aktiven Zentrum sind Y522 in TPS6, was bei Austausch zur Einschränkung der Reprotonierung führt (Köllner et al. 2008), und Y382, Y528 in TPS4 (Köllner, O'Maille et al. 2006).

4 Diskussion

Das Positions-Analogon zu den oben genannten Tryptophanen ist in TPS10 W258. Dieses wird von zwei Phenylalaninen (F498, F512) flankiert und bildet das Zentrum des aktiven Zentrums (Abb. 46). Bei Mutagenesestudien an den Position W258, F512 und F498 zeigte sich, dass F498 keinen Effekt auf die Reaktion in TPS10 hat. Der Austausch der aromatischen Seitenketten durch aliphatische Seitenketten hatte keine Auswirkungen auf die Aktivität, allerdings ging die Fähigkeit zur Bildung von zyklischen Terpenen verloren. Die Reaktion mit (*Z,E*)-FPP zeigte das durch die Mutation nicht nur die Isomerisierung eingeschränkt wurde sondern sich auch die Zusammensetzung des Terpenspektrums verändert hatte. Durch die Doppelmutante N430D und W258F konnte das Produktspektrum der W258F-Mutante bei der Reaktion mit (*E,E*)-FPP reproduziert werden. Dies bewies den Einfluss auf die Isomerisierungsreaktion in Folge einer veränderten Lage des Substrats im aktiven Zentrum der W258-Mutante, was durch die Verschiebung des Chelatkomplexes (N430D) wieder restauriert werden konnte (s.o.). Warum sich allerdings die Zusammensetzung der zyklischen Terpene durch die Verkürzung um eine CH₂-Gruppe zugunsten von monozyklischen Terpenen änderte blieb offen. Antworten liefert die Betrachtung der Thermodynamik. So ist das in der Mutante dominierende monozyklische β -Sesquiphellandren stabiler als (*E*)- α -Bergamoten, dem zyklischen Hauptprodukt von TPS10. Es wäre daher naheliegend den räumlich großen und starren Indolring des Tryptophans als Ursache für die selektive Bildung von (*E*)- α -Bergamoten bei TPS10 anzunehmen. W258 zwingt das System zur Bildung des kompakteren bipyklischen (*E*)- α -Bergamoten. Außerdem stabilisiert der aromatische Ring das Carbokation im Intermediat anscheinend an Position C₃. Dies ist die gleiche Deprotonierungsstelle zur Bildung von β -Sesquiphellandren und (*E*)- α -Bergamoten. Fällt der aromatische Ring (W258 o. F258 o. Y258) weg, sinkt die spezifische Produktbildung weiter (W258M, W258L).

F512-Mutanten sind Positionsanaloge auf der J-K-Schleife von Y528L in TPS4 (Köllner, O'Maille et al. 2006) und Y520 in der epi-Aristolochensynthese (Starks, Back et al. 1997). Das Phenylalanin trägt zur Bildung von (*E*)- α -Bergamoten bei. Ein räumlich etwas kleineres, flexibleres Leucin an dieser Position verstärkt die Bildung von Sesquisabinen A. Offensichtlich lässt durch das Fehlen des aromatischen Rings die Stabilisierung des Carbokations an Position C₃ zugunsten der Stabilisierung an Position C₆ nach. Das führt dadurch wahrscheinlich häufiger zur Bildung von 2-6-Ringschlüssen. In der Summe überwiegt immer noch der Anteil der Bipyklen. Interessant wäre eine Mutation an dieser Stelle mit dem noch kleineren Alanin.

4 Diskussion

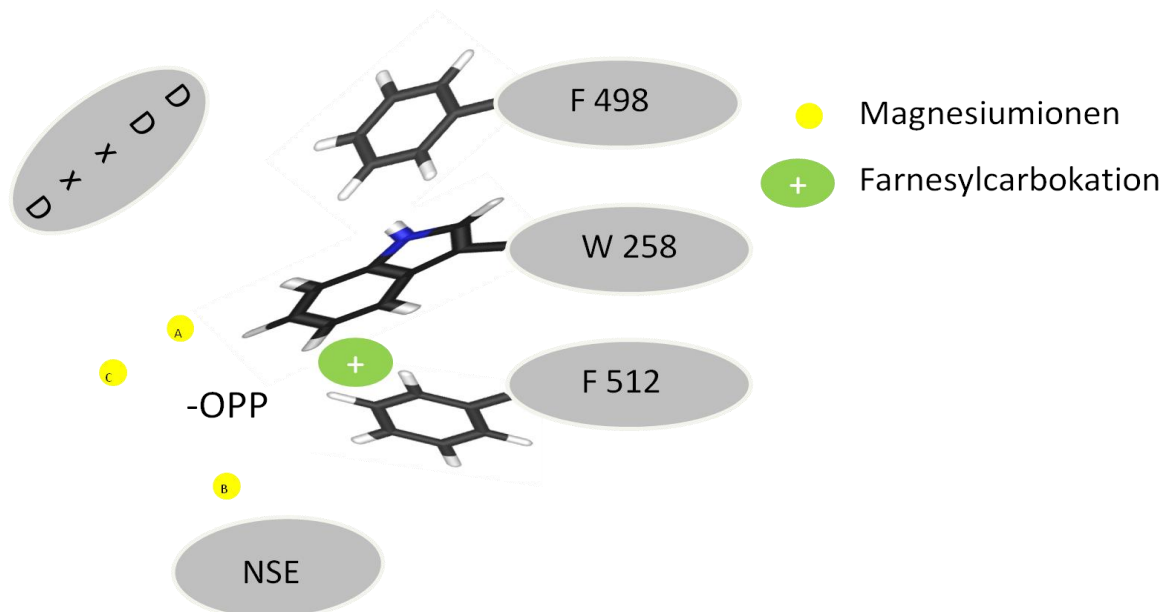


Abb. 46 Modell vom Inneren des aktiven Zentrums

Das Schema zeigt die Fixierung des Diphosphats durch drei Magnesiumionen die von den Metallbindemotiven koordinativ gebunden sind. Das Diphosphat beeinflusst durch seine Ladung die Isomerisierung und führt bei TPS10 durch eine 1,6-Zyklisierung zum Bisaboly carbokation. Durch die damit verbundene Verschiebung des Carbokations in Richtung Innenraum des aktiven Zentrums, beeinflussen dort vorliegende aromatische Seitenketten die weitere Produktbildung. Diese stabilisieren durch Carbokation- π -Interaktionen Hydrid-Umlagerungen und damit die Position des Carbokations. Die Stabilisierungsenergie beträgt dabei ca. 50 kJ/mol (Brandt, Bräuer et al. 2009) und führt je nach Lage zum spezifischen Produktspektrum. Bei TPS10 beeinflusst W258 die Stabilisierung hauptsächlich an Position C₃. Durch anschließende Deprotonierung wird vor allem (*E*)- α -Bergamoten und β -Sesquiphellandren gebildet.

4.3 Deprotonierung über SH-Gruppen

Die Deprotonierung stellt neben dem lipophilem Inneren des aktiven Zentrums und dem Metallionen-Bindungs-Komplex am Eingang des aktiven Zentrums, die dritte Schlüsselposition bei der Betrachtung der Bildung von Terpenen dar. Seit der Kristallisierung der 5-*epi*-Aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* existieren eine Reihe von Theorien zur Deprotonierung bei Terpensynthasen, ohne zu einer endgültigen Lösung zu kommen.

Bei der Aristolochensynthase wurde ein alleinstehendes Tryptophan als potentieller Protonenakzeptor identifiziert. Der Indol-Ring sollte die Deprotonierung an spezifischer Position ermöglichen (Starks, Back et al. 1997). Das Analoge Tryptophan zur Aristolochensynthase in TPS10 stellte W258 dar. Dieses wurde bereits als Stabilisator für Carbokationen diskutiert. Ein Austausch mit Alanin führte bei TPS10 jedoch nicht zur Inaktivierung, wie es bei einem monopolistischen Protonenakzeptor der Fall wäre.

Mit der Kristallisation der Trichodiensynthase aus *Fusarium sporotrichioides* (Rynkiewicz, Cane et al. 2001) galt das erste Aspartat (D100) des DDxxD-Motiv oder das fixierte Diphosphat als potentielle Protonenakzeptoren. Spätere Untersuchungen an der Aristolochensynthase bezüglich Deprotonierung führten zu einem Tyrosin (Caruthers, Kang et al. 2000) und später zu einem Wassermolekül, welches im aktiven Zentrum fixiert ist (Felicetti and Cane 2004). In beiden Fällen sollten die Funktion einer Protonierungs/Deprotonierungs-Position dargestellt werden. Die Fixierung eines Wassermoleküls im aktiven Zentrum zusammen mit einem Produkt konnte an der (+)-Bornyldiphosphatsynthase gezeigt werden (Whittington, Wise et al. 2002).

4 Diskussion

Aufgrund der Vielzahl an Theorien wurde in der vorliegenden Arbeit am Homologiemodell untersucht, welche Aminosäuren bei TPS10 potentielle H^+ -Akzeptoren darstellen. Der Theorie die das Diphosphat als Protonenakzeptor darstellt konnte nicht untersucht werden, da es bisher nicht möglich ist das Diphosphat als Reaktionspartner auszuschließen. Das Homologiemodell von TPS10 zeigte einige interessante Positionen, darunter Aspartate, Glutamate und Cysteine die möglicherweise in Frage kamen. Diese lagen alle auf der A-C- oder der J-K-Schleife, also jene Regionen die eine starke Konformationsänderung bei der Substratbindung durchlaufen (Starks, Back et al. 1997). Sie bilden wie in Abb. 47 die Flanken zwischen Eingang und lipophilem Kern des aktiven Zentrums. Mutationsstudien zeigten folgedessen einen Aktivitätsverlust bei D510A, C255A und D250L. Durch den Austausch C255D und D510C wurde die Aktivität teilweise wieder hergestellt. Bei D510 und C255 konnte im Homologiemodell eine Wechselwirkung mit anderen Aminosäuren ausgeschlossen werden. Daher gehe ich von einer Deprotonierung an diesen Positionen aus. Eine katalytische Kaskade über weitere Aminosäuren ist nicht auszuschließen und würde für die vielseitige Bildung von Terpenen sprechen

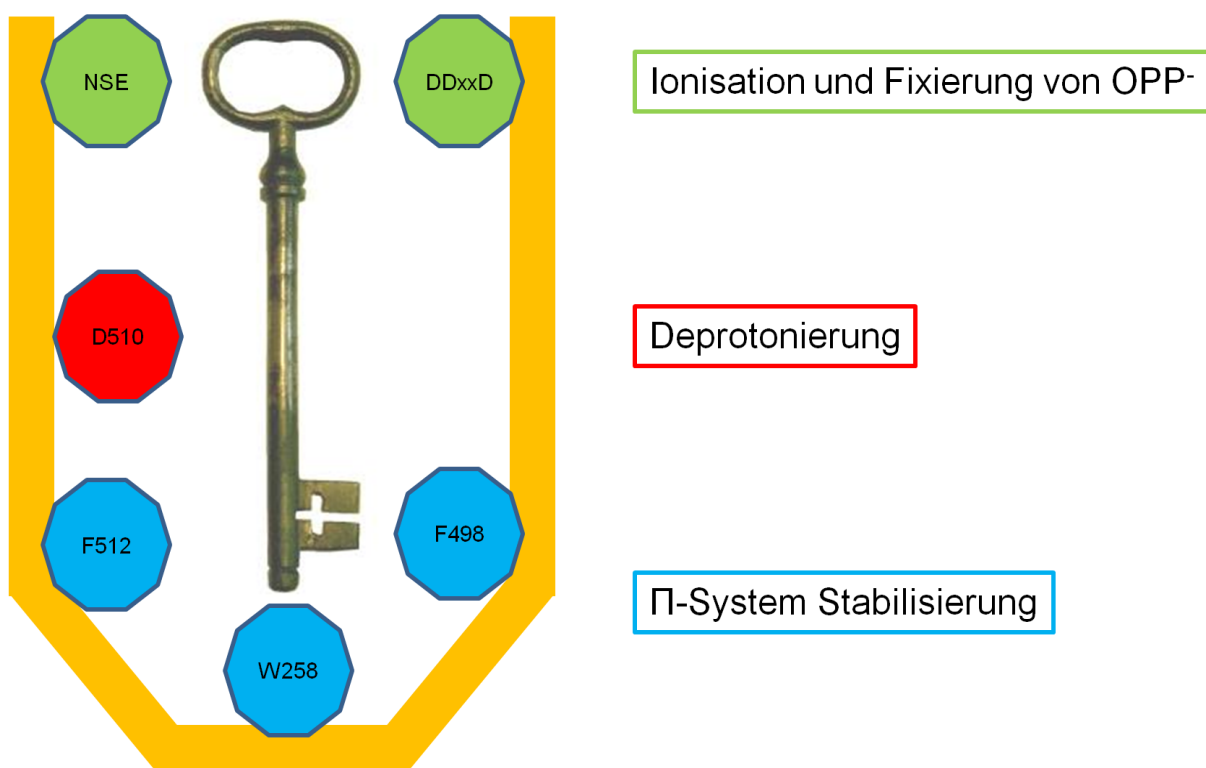


Abb. 47 Steuerung des Reaktionsmechanismus

Die Reaktion von TPS10 unterliegt generell einer thermodynamischen Kontrolle. Bei genauerer Betrachtung entstehen jedoch Widersprüche zum Produktspektrum. Es erfolgt aufgrund enzymatischer Gegebenheiten die kinetische Kontrolle. In der Abbildung sind Schlüsselpositionen schematisch dargestellt, die man als Stellschrauben im Reaktionsmechanismus (RM) bezeichnen könnte. Es sind also Positionen die eine kinetische Kontrolle des RM auf unterschiedliche Weise hervorrufen. Die Isomerisierung wird maßgeblich durch den Aufbau des Metallionen-Binde-Komplexes beeinflusst, welcher von den Metallbindemotiven am Eingang des aktiven Zentrums abhängen. Aromatische Aminosäuren beeinflussen die Hydrid-Umlagerungen und die daraus favorisierten Carbokationen werden im Anschluss durch Aminosäuren der flexiblen Flanken des aktiven Zentrums (A-C-Schleife, J-K-Schleife) deprotoniert.

4.4 Trunkierung dienen der Klärung der Funktion des N-Terminus

Terpensynthasen egal ob Mono, Sesqui, Di oder Triterpensynthasen haben wahrscheinlich gemeinsame Vorfahren aus denen die Evolution die zahlreichen heute bekannten Enzyme bildete (Köksal et al. ; Zhou, Gao et al. 2012). Mit der bifunktionalen Abietadien Synthase aus *Abies grandis* wurde wahrscheinlich die erste Ableitung von der ursprünglichen Terpinoidzyklase gefunden (Peters, Carter et al. 2003). Die Kristallstruktur dieser bifunktionalen Terpensynthase (Zhou, Gao et al. 2012) zeigt einen aus drei Domänen (α , β , γ) bestehenden Aufbau wie er auch bei anderen monofunktionalen Diterpensynthasen gefunden wurde. (Köksal, Jin et al. ; Zerbe, Chiang et al.) (Abb. 48). Die bisherige Theorie beschreibt die Entstehung durch Fusion einer bakteriellen Diterpenzyklase mit einer Domäne mit einer aus zwei Domänen bestehenden Terpenzyklase. Darauf begründet sich auch die Bifunktionalität durch zwei aktive Zentren, welche die Zyklisierung durch Ionisierung oder Protonierung betreiben. In *Abies grandis* wurde die Kopplung beider Zentren gezeigt. Durch Protonierung entsteht aus GGPP zyklisches Copolyldiphosphat (CPP). Dieses dient dem zweiten aktiven Zentrum als Edukt. Durch Abspaltung des Diphosphats entstehen ionisierte Carbokationen. Durch stabilisierende Aminosäuren und nach diversen Umlagerungsreaktionen bilden sich verschiedene Intermediate und daraus die Terpene. Die Kopplung von zwei verschiedenen Reaktionstypen bei einem Enzym bedingt unspezifische Reaktionen der Pflanze auf Umwelteinflüsse. Daher finden bei evolutionär fortgeschrittenen Organismen die Zyklisierungen getrennt auf verschiedenen Enzymen statt.

Als Klasse 1 bezeichnet man Terpensynthasen wo durch Abspaltung des Diphosphats Carbokationen entstehen, welche durch elektrophile Addition zyklisieren (Christianson 2006). Die Abspaltung bedingt ein trinukleäres Mg^{2+} -Komplex und weitere Wasserstoffbrückendonatoren (R, K, H), welche stabilisierend auf diesen Komplex wirken und die Reaktionsenergie senken (Brandt, Bräuer et al. 2009). Klasse 2 Terpensynthasen zyklisieren an C-C-Doppelbindungen aufgrund einer vorherigen Protonierung. Charakterisiert werden sie v.a. durch ein DxDD-Motiv (Kawaide et al. 2000; Peters, Ravn et al. 2001; Prsic et al. 2007). TPS10 gehört zur großen Gruppe der Klasse 1 Terpensynthasen. Bei der Betrachtung des TPS10-Homologiemodells fällt die Ähnlichkeit zu den Diterpensynthasen auf. Das aktive Zentrum für die Ionisierungsreaktion liegt analog zu AgAS in der α -Domäne, welche bei TPS10 die C-terminale Domäne darstellt. Die N-terminale Domäne korreliert zur β -Domäne in AgAS (Zhou, Gao et al. 2012). Die γ -Domäne fehlt wie bei allen bekannten Klasse 1 Sesquiterpenzyklasen (Starks, Back et al. 1997). Diese wird auch als Insertionsdomäne bezeichnet und bedeutet, dass ein Teil der β -Domäne aus Aminosäuren vom Anfang der Aminosäuresequenz gebildet wird. Danach sind Aminosäuren der γ -Domäne eingeschoben und die β -Domäne setzt sich fort. Diese ist allerdings klar von der Aminosäuresequenz der α -Domäne getrennt. Die β -Domäne trägt die Merkmale des aktiven Zentrums, welches bei AgAS Klasse 2 Zyklisierungen durchführt und zum ersten Mal bei der Squalene-Hopen-Synthase gezeigt wurde (Wendt, Poralla et al. 1997). Diese Merkmale sind ein DxDD-Motiv und ein KR-Motiv. Das DxDD-Motiv ist Teil einer Schleifen-Region und KR ist direkt am Anfang Teil einer variablen Schleifen-Region, welche bei AgAS die Funktion des ersten aktiven Zentrums beeinflusst (Zyklisierung durch Ionisation). Bei Monoterpensynthasen gibt es analog zum KR-Motiv ein RR-Motiv, was für eine Deletion der Insertionsdomäne spricht (Williams, McGarvey et al. 1998). Bei TPS10 wurden diese Motive in vergleichbarer Lage identifiziert ($K_{25}R_{26}$, $D_{86}XD_{88}D_{89}$). Im Unterschied zu AgAS und der Limonensynthase aus *Mentha spicata*, ist das KR-Motiv in TPS10 Teil einer α -Helix und steht

4 Diskussion

damit nicht in Verbindung zum aktiven Zentrum. Dies steht im Gegensatz zu den meisten bisher untersuchten Terpensynthesen (Davis and Croteau 2000). Die Aufgabe der Stabilisierung des Ionisationskomplexes übernehmen wahrscheinlich die wie bereits beschriebenen Arginine in der Nähe der Metallbindemotive. Damit wäre eine mögliche Funktion des variablen N-terminalen Endes negiert was bei der β -Domäne (N-terminale Domäne) lediglich auf ein evolutionäres Relikt schließen ließe.

Theorie der Lidfunktion des N-Terminus

Eine weitere Theorie beschreibt den variablen Teil des N-Terminus als Schutz der Reaktiven Carbokationen vor dem Angriff von Wasser. Dies wurde aus Unterschieden der Kristallstrukturen bei Substratbindung und ohne Substrat beobachtet (Starks, Back et al. 1997; Little and Croteau 2002; Peters, Carter et al. 2003). Zur Untersuchung der Undurchlässigkeit von Wasser aufgrund des variablen N-Terminus bei Sesquiterpensynthesen wurden diese durch Trunkierungen verkürzt (Little and Croteau 2002). Dabei sank der Anteil an zyklischen Terpenen und gleichzeitig stieg der Anteil an Terpenalkoholen. Vor allem der Anteil an Nerolidol als erstes Intermediat der Reaktionskaskade der untersuchten δ -Selinensynthese war erhöht. Dies spricht für die Theorie der Lidfunktion. Bei TPS10 konnte eine vermehrte Bildung von Nerolidol aufgrund von N-terminalen Trunkierungen nicht beobachtet werden. Somit ist diese Theorie nicht auf TPS10 übertragbar. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Terpensynthesen fehlen bei TPS10 im variablen Bereich des N-Terminus bis auf H₇ polare Aminosäuren in Form von Arginin, Lysin und Histidin. H₇ als einziges Lewis-Säure-Äquivalent zum KR-Motiv in Diterpensynthesen bzw. RR-Motiv in Mono- und Sesquiterpensynthesen, beeinflusst als endständige Aminosäure den Ionisationskomplex nicht, was zum Verlust der Zyklisierung führte. Ein analoges Experiment konnte in der Limonensynthese von *Mentha spicata* gezeigt werden (Williams, McGarvey et al. 1998). Die weitere Verkürzung führte ab D₁₃ zur Inaktivität. Eine vermehrte Bildung von Nerolidol oder anderen Terpenalkoholen konnte nicht beobachtet werden, was gegen die Lidfunktion des N-Terminus bei TPS10 spricht (Peters, Carter et al. 2003). Offensichtlich war die Bildung des Ionisationskomplexes beeinträchtigt, was eventuell zu einer kompetitiven Hemmung von TPS10 durch das Substrat geführt hat. Durch Mutagenese-Studien wurde Tryptophan¹¹ als ursächlich für diesen Funktionsverlust identifiziert. Wahrscheinlich kommt es mit dem aromatischen Ringsystem zu π - π -Interaktionen und damit zur Steigerung der Stabilität. Ein Reaktionspartner konnte im Rahmen dieser Arbeit leider nicht gefunden werden. Ein Abschluss des Substrat-Enzymkomplex vor dem Lösungsmittel Wasser zum Schutz der reaktiven Intermediate muss anderweitig erfolgen und sollte untersucht werden.

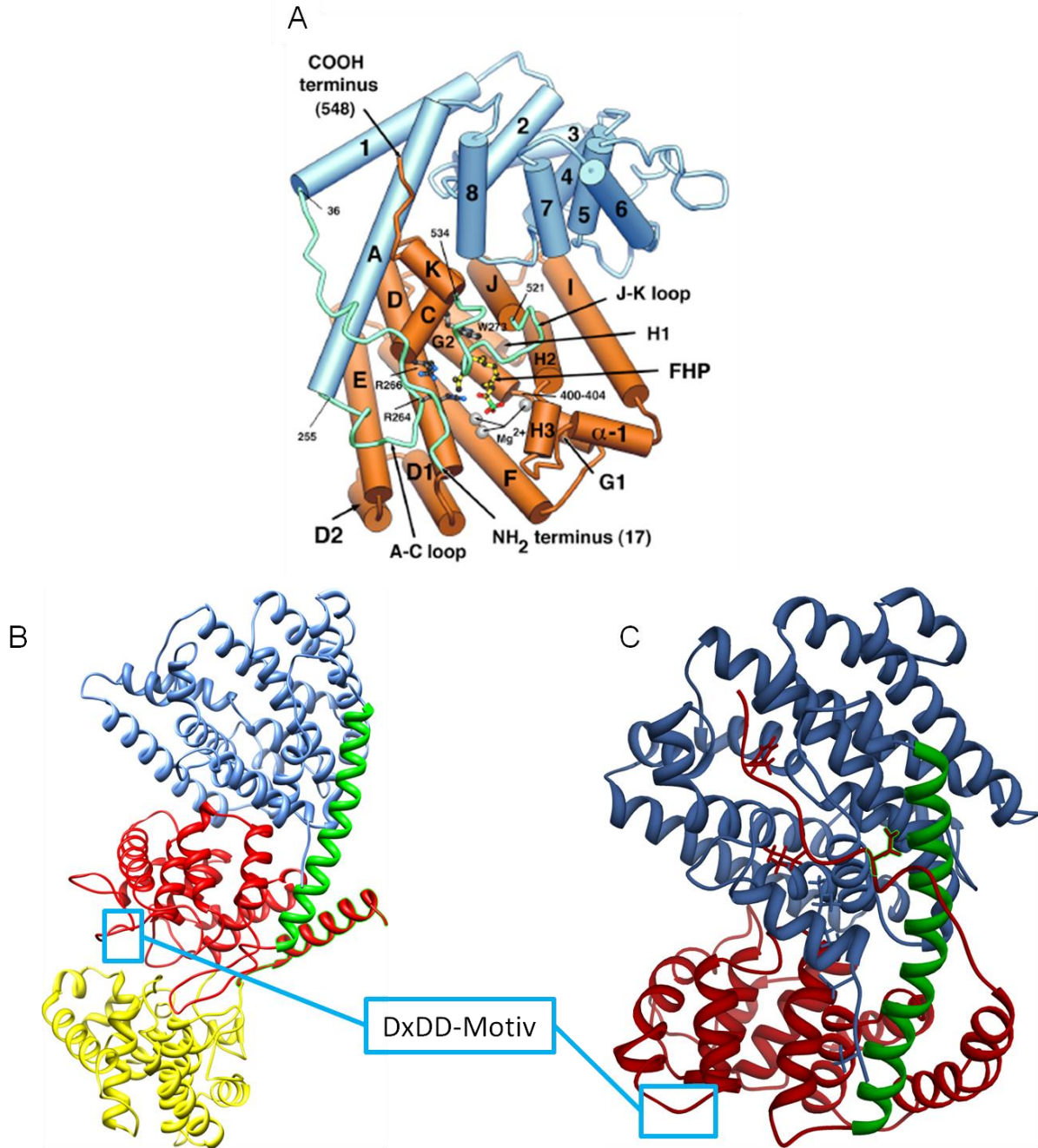


Abb. 48 Terpensynthasen im Überblick

Die erste Röntgenkristallstruktur einer Terpensynthase war die 5-epi-Aristolochensynthase (A). Sie besteht aus zwei Domänen die einen α -Helicalen Aufbau zeigen. Das aktive Zentrum liegt im Bereich der C-terminalen Domäne, dessen α -Helices alphabetisch geordnet sind. Funktionell gehört sie zu den ionisationsabhängigen Klasse 1 Terpensynthasen. Das Homologiemodell von TPS10 (C) bezieht sich darauf und zeigt einen vergleichbaren Aufbau und Funktion. Die bifunktionale Abietadiensynthase (B) stellt den evolutionären Ursprung der heutigen Terpensynthasen dar (Peters, Carter et al. 2003). Sie besitzt eine zusätzliche Insertionsdomäne und ein zweites aktives Zentrum. Dieses katalysiert im Gegensatz zu Klasse 1 TPS eine Protonierung als Startreaktion. Das DxDD-Motiv ist charakteristisch für diese Enzymklasse und wurde auch bei TPS10 in vergleichbarer Position gefunden und belegt die wahrscheinliche Verwandtschaft. (B) und (C) sind Homologiemodelle, obwohl von (B) Röntgenkristallstrukturanalysen vorhanden sind. Der Vergleich zeigt eine starke Verkürzung des N-terminalen Endes (rot) im Homologiemodell, welches jedoch Einfluss auf die Produktbildung hat. Diese Herausforderung wurde im optimierten TPS10-Homologiemodell besser gelöst und zeigt die Lage des N-terminalen Endes in der Nähe des aktiven Zentrums.

4 Diskussion

Trunkierung des C-Terminus

Verkürzungen am C-terminalen Ende wurden in dieser Arbeit analog zu Arbeiten an Diterpensynthasen (Peters, Carter et al. 2003) durchgeführt. Die Verkürzung führte in den Fällen, wo Teile einer Domäne gekürzt wurden, zur Fehlfaltung und damit zur Einlagerung in Einschlussverbindungen, in jedem Fall aber zur Inaktivierung. Einschlussverbindungen bildeten sich bei TPS10 nicht und bei geringer Verkürzung um fünf Aminosäuren erfolgte bereits ein Aktivitätsverlust. Dieser konnte auf eine Interaktion vom C-terminalen F₅₂₆ mit Y₂₂₅ der α -Helix A zurück geführt werden (Abb. 49). Wahrscheinlich bilden sich π - π -Bindungen zwischen den aromatischen Ringsystemen aus. Die α -Helix A ist die Verbindungshelix zwischen der N- und C-terminalen Domäne ($\beta\gamma$ -Domäne und α -Domäne). Wahrscheinlich spielt die Verbindung des variablen C-Terminus mit Helix A eine Rolle bei der Katalyse, indem Helix A als Fixpunkt zwischen den Domänen dient. Dieser wird zur Ausrichtung der A-C-Schleife und J-K-Schleife genutzt, welche ihre Konformation bei Substratbindung verändern. Ein Kontaktverlust führt folglich zu einer fehlerhaften Konformation und dadurch wahrscheinlich zur kompetitiven Hemmung durch das nicht ionisierte Substrat (Zerbe, Chiang et al.).

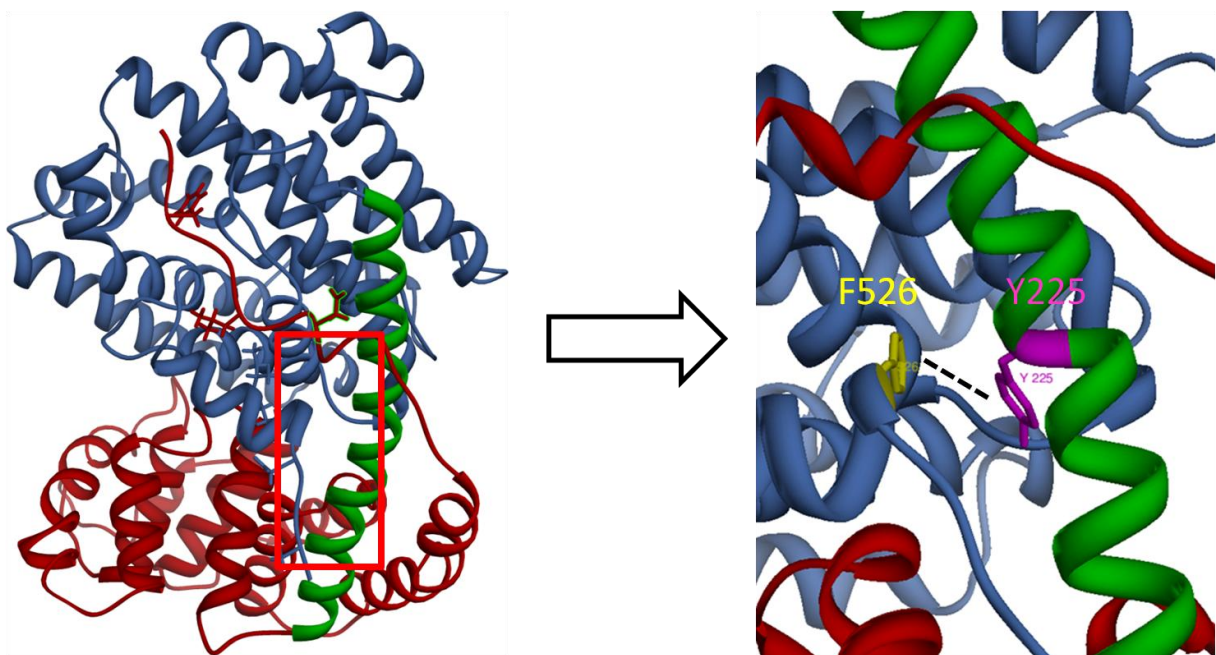


Abb. 49 π - π -Interaktionen als stabilisierende Komponente im c-terminalen Bereich

Nach der schrittweisen Durchführung von Trunkierungen am N- und C-Terminus zeigten die Mutanten keine Aktivität mehr. Die daraufhin erfolgten Mutationstudien deuteten auf stabilisierende Einflüsse aromatischer Aminosäuren hin. Der C-Terminus (blau) interagiert durch F526 mit Y225 der α -Helix A über π - π -Wechselwirkungen. Im Bereich des N-Terminus gilt W11 als entscheidend. Es konnte jedoch kein Reaktionspartner identifiziert werden.

5 Zusammenfassung

Die Maisinzuchtlinie B73 bildet ein komplexes Bouquet volatiler Substanzen das vorrangig aus Sesquiterpenen besteht. Ein Teil davon wird konstitutiv gebildet, ein anderer Teil fakultativ z.B. nach Herbivorie. Die fakultativen Sesquiterpene werden von Terpensynthasen gebildet, welche durch die Fraßschädigung in ihrer Biosynthese induziert werden. Dazu gehört TPS10, das nur in Blättern der Pflanze gebildet wird. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Reaktionsmechanismus dieses Enzyms besser zu verstehen.

Am Beginn standen Betrachtungen zum Einfluss der Faltung bzw. Strukturen des Proteins auf dessen Funktion. Es wird davon ausgegangen das nach der Bindung des Substrats im aktiven Zentrum eine Konformationsänderung der J-K-Loop-Regionen zum Verschluss des aktiven Zentrums führen. Welchen Einfluss das N-terminale Ende hat, welches in Kristallstrukturen in der Nähe zum Eingang ins aktive Zentrum lag, war nicht bekannt. Durch Trunkierungen des Proteins und anschließenden Stabilitätsuntersuchungen konnte die Bedeutung für die Funktion des Proteins gezeigt werden. Insbesondere im C-terminalen Teil konnte der Einfluss von stabilisierenden π - π -Wechselwirkungen zwischen aromatischen Aminosäuren gezeigt werden.

Die Fähigkeit von TPS10 viele Produkte aus einem Substrat zu bilden, begründet sich aus der Isomerisierung des Substrats im Verlauf der Reaktion (Abb. 7). Diese Reaktion wurde in silico thermodynamisch untersucht. Das Ergebnis war eine sehr hohe Energiebarriere im geläufigen Modell der Triade Rephosphatierung - Isomerisierung - Dephosphatierung. Untersuchungen im Bereich der Metallbindemotive lieferten erste Hinweise auf einen modifizierten Mechanismus (Abb. 46). Die Fixierung des abgespalteten Diphosphats nach der Initiation der Reaktionskaskade in der Nähe des Substrats beeinflusst demnach die Doppelbindung C2-C3 und ermöglicht so die Isomerisierung vom *trans*- zum *cis*-Substrat. Dies wäre den thermodynamischen Berechnungen zu Folge auch energetisch günstiger. Die Mutation N430D innerhalb des Metallbindemotivs führte bei Inkubation mit (*E,E*)-FPP zu einem deutlich erhöhten Anteil anzyklischen Terpenen (Abb. 34). Das Mengenverhältnis innerhalb der zyklischen Terpene blieb bezüglich zum Wildtyp konstant.

Im Inneren des aktiven Zentrums liegt ein lipophiles Milieu vor welches durch hydrophobe Aminosäuren erzeugt wird. Die aromatischen Aminosäuren nehmen dabei die Rolle eines Reaktionspartners ein und interagieren mit den sich im Reaktionsverlauf bildenden Carbokationen mit Hilfe ihres π -Elektronensystems. Diese schwachen Wechselwirkungskräfte stabilisieren verschiedene Konformationen und führen auf diese Weise zum charakterischen Sesquiterpenspektrum. Dieser Bereich ist sehr empfindlich und resultiert in Verschiebungen des Sesquiterpenspektrums was durch Untersuchungen in diesem Bereich gezeigt wurde.

5 Summary

The leaves of the maize inbred line B73 forms complex blends of volatiles that consist mainly of sesquiterpenes. Some of the volatiles are formed constitutively but most are only released after the plant was damaged by a herbivore. The enzyme class responsible for the biosynthesis of volatile terpenes are the terpene synthases. In maize, most of the herbivore-induced sesquiterpenes are produced by the multiproduct terpene synthase TPS10 which is active in herbivore-damaged leaves. This work focused on TPS10 to elucidate the complex reaction mechanism of multiproduct terpene synthases.

To study structure-function relationships in the active site of the terpene synthases, models of TPS10 protein structure were utilized. It was proposed that a change of conformation at the J-K-loop region that leads to a closure of the active center. X-Ray crystal structures of homologous proteins indicated that the N-terminal region of the protein is situated near the entrance of the active site might also influence this mechanism. Truncations of the N- and C-terminal region show the relevance for the function of TPS10. Especially the aromatic residues in the C-terminal region stabilized the protein structure with π - π -interactions.

The isomerisation reaction is a crucial element of the TPS10 reaction mechanism that is responsible for the formation of multiple products. The isomerisation is catalyzed by a canonical triad rephosphation-isomerisation-dephosphation and has a high energy barrier. Examination of the metal cofactor binding site indicate modified mechanism. After the initial dephosphation, the diphosphate is fixed near the rest of the former substrate. The proximity of the diphosphate leads to an influence on the C2-C3 double bond that allows isomerisation from *trans* to *cis* conformation. This model is thermodynamically favored and was confirmed by mutational analysis. The mutation N430D affects the second metal binding motif at the entrance of the active site. After incubation with (*E,E*)-FPP, this mutation produces an relevant amount of cyclic products. However, the ratios among the quantities of cyclic terpenes remained similar to those of the wild type.

The lipophilic milieu inside the active site is formed by hydrophobic amino acids. Amino acids with aromatic sidechains provide π -electron systems that stabilize the carbocation intermediates of the reaction. π -electron systems at several locations within the active site will stabilize different conformations of the intermediates and thereby allow for multiple products to be formed.

6 Literaturverzeichnis

- Aaij, C. and P. Borst (1972). "GEL-ELECTROPHORESIS OF DNA." Biochimica Et Biophysica Acta **269**(2): 192-8.
- Aaron, J. A. and D. W. Christianson (2010). "Trinuclear metal clusters in catalysis by terpenoid synthases." Pure and applied chemistry. Chimie pure et appliquee **82**(8): 1585.
- Advanced Chemistry Development, I., Toronto, On, Canada (2012). "ACD/ ChemSketch Freeware, version 12.00."
- Anfinsen, C. B., D. Steinberg, et al. (1956). "Kinetic aspects of assembly and degradation of proteins." Science (New York, N.Y.) **124**(3218): 389-95.
- Arnold, K., L. Bordoli, et al. (2006). "The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling." Bioinformatics **22**(2): 195-201.
- Arthur, C. L. and J. Pawliszyn (1990). "Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers." Analytical chemistry **62**(19): 2145-2148.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "RAPID ALKALINE EXTRACTION PROCEDURE FOR SCREENING RECOMBINANT PLASMID DNA." Nucleic Acids Research **7**(6): 1513-1523.
- Biswas, K. M. and A. H. Jackson (1989). "ELECTROPHILIC SUBSTITUTION IN INDOLES .17. THE CYCLIZATION OF (DIMETHOXYPHENYLACETYL)TRYPTAMINES TO SPIROPENTACYCLIC INDOLE-DERIVATIVES." Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions **1**(11): 1981-1986.
- Bos, R., H. J. Woerdenbag, et al. (1997). "Composition of the essential oils from underground parts of *Valeriana officinalis* L. sl and several closely related taxa." Flavour and fragrance journal **12**(5): 359-370.
- Brandt, W., L. Braeuer, et al. (2009). "Molecular and structural basis of metabolic diversity mediated by prenyldiphosphate converting enzymes." Phytochemistry (Amsterdam) **70**(15-16, Sp. Iss. SI): 1758-1775.
- Brandt, W., L. Bräuer, et al. (2009). "Molecular and structural basis of metabolic diversity mediated by prenyldiphosphate converting enzymes." Phytochemistry **70**(15-16): 1758-1775.
- Buckingham, J. (1993). Dictionary of natural products, CRC Press.
- Byun-McKay, A., K. A. Godard, et al. (2006). "Wound-induced terpene synthase gene expression in sitka spruce that exhibit resistance or susceptibility to attack by the white pine weevil." Plant Physiology **140**(3): 1009-1021.
- Cane, D. E. and I. Kang (2000). "Aristolochene synthase: Purification, molecular cloning, high-level expression in *Escherichia coli*, and characterization of the *Aspergillus terreus* cyclase." Archives of Biochemistry and Biophysics **376**(2): 354-364.
- Cane, D. E., J. L. Pawlak, et al. (1990). "STUDIES OF THE CRYPTIC ALLYLIC PYROPHOSPHATE ISOMERASE ACTIVITY OF TRICHODIENE SYNTHASE USING THE ANOMALOUS SUBSTRATE 6,7-DIHYDROFARNESYL PYROPHOSPHATE." Biochemistry **29**(23): 5476-5490.
- Cane, D. E., J. K. Sohng, et al. (1994). "PENTALENENE SYNTHASE - PURIFICATION, MOLECULAR-CLONING, SEQUENCING, AND HIGH-LEVEL EXPRESSION IN *ESCHERICHIA-COLI* OF A TERPENOID CYCLASE FROM *STREPTOMYCES UC5319*." Biochemistry **33**(19): 5846-5857.
- Cane, D. E., Q. Xue, et al. (1996). "Trichodiene synthase. Probing the role of the highly conserved aspartate-rich region by site-directed mutagenesis." Biochemistry **35**(38): 12369-12376.
- Caruthers, J. M., I. Kang, et al. (2000). "Crystal structure determination of aristolochene synthase from the blue cheese mold, *Penicillium roqueforti*." Journal of Biological Chemistry **275**(33): 25533-25539.

6 Literaturverzeichnis

- Chaykin, S., J. Law, et al. (1958). "Phosphorylated intermediates in the synthesis of squalene." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **44**(10): 998.
- Chemical Computing Group (2012). "Molecular Operating Environment (MOE), 2012.10."
- Cheng, A. X., C. Y. Xiang, et al. (2007). "The rice (E)-beta-caryophyllene synthase (OsTPS3) accounts for the major inducible volatile sesquiterpenes." Phytochemistry **68**(12): 1632-1641.
- Christianson, D. W. (2006). "Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases." Chemical reviews **106**(8): 3412.
- Colovos, C. and T. O. Yeates (1993). "VERIFICATION OF PROTEIN STRUCTURES - PATTERNS OF NONBONDED ATOMIC INTERACTIONS." Protein Science **2**(9): 1511-1519.
- Corpet, F. (1988). "MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT WITH HIERARCHICAL-CLUSTERING." Nucleic Acids Research **16**(22): 10881-10890.
- Croteau, R., D. Satterwhite, et al. (1988). "Biosynthesis of monoterpenes. Stereochemistry of the enzymatic cyclization of geranyl pyrophosphate to (-)-endo-fenchol." Journal of Biological Chemistry **263**(30): 15449-15453.
- D'Alessandro, M. and T. C. J. Turlings (2005). "In situ modification of herbivore-induced plant odors: A novel approach to study the attractiveness of volatile organic compounds to parasitic wasps." Chemical Senses **30**(9): 739-753.
- Davis, E. M. and R. Croteau (2000). "Cyclization enzymes in the biosynthesis of monoterpenes, sesquiterpenes, and diterpenes." Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids **209**: 53-95.
- Degenhardt, J., J. Gershenzon, et al. (2003). "Attracting friends to feast on foes: engineering terpene emission to make crop plants more attractive to herbivore enemies." Current Opinion in Biotechnology **14**(2): 169-176.
- Deligeorgopoulou, A., S. E. Taylor, et al. (2003). "Stabilisation of eudesmane cation by tryptophan 334 during aristolochene synthase catalysis." Chem. Commun.(17): 2162-2163.
- Dougherty, D. A. (1996). "Cation-pi interactions in chemistry and biology: A new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp." Science **271**(5246): 163-168.
- Facchini, P. J. and J. Chappell (1992). "GENE FAMILY FOR AN ELICITOR-INDUCED SESQUITERPENE CYCLASE IN TOBACCO." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **89**(22): 11088-11092.
- Faraldos, J. A., V. Gonzalez, et al. (2012). "Probing the Mechanism of 1,4-Conjugate Elimination Reactions Catalyzed by Terpene Synthases." Journal of the American Chemical Society **134**(51): 20844-20848.
- Faraldos, J. A., D. J. Miller, et al. (2012). "A 1,6-Ring Closure Mechanism for (+)-delta-Cadinene Synthase?" Journal of the American Chemical Society **134**(13): 5900-5908.
- Felicetti, B. and D. E. Cane (2004). "Aristolochene synthase: Mechanistic analysis of active site residues by site-directed mutagenesis." Journal of the American Chemical Society **126**(23): 7212-7221.
- Gennadios, H. A., V. Gonzalez, et al. (2009). "Crystal Structure of (+)-delta-Cadinene Synthase from *Gossypium arboreum* and Evolutionary Divergence of Metal Binding Motifs for Catalysis." Biochemistry **48**(26): 6175-6183.
- Gill, S. C. and P. H. von Hippel (1989). "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data." Analytical biochemistry **182**(2): 319-326.
- Guex, N. and M. C. Peitsch (1997). "SWISS MODEL and the Swiss Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling." Electrophoresis **18**(15): 2714-2723.
- Hänsel-Sticher (2007). "Pharmakognosie Phytopharmazie 8.Auflage."
- Hoballah, M. E. and T. C. J. Turlings (2005). "The role of fresh versus old leaf damage in the attraction of parasitic wasps to herbivore-induced maize volatiles." Journal of Chemical Ecology **31**(9): 2003-2018.

6 Literaturverzeichnis

- Hosfield, D. J., Y. M. Zhang, et al. (2004). "Structural basis for bisphosphonate-mediated inhibition of isoprenoid biosynthesis." Journal of Biological Chemistry **279**(10): 8526-8529.
- Jindal, G. and R. B. Sunoj "Revisiting sesquiterpene biosynthetic pathways leading to santalene and its analogues: a comprehensive mechanistic study." Organic & Biomolecular Chemistry **10**(39): 7996-8006.
- Kawaide, H., R. Imai, et al. (1997). "ent-kaurene synthase from the fungus *Phaeosphaeria* sp. L487 - cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of a bifunctional diterpene cyclase in fungal gibberellin biosynthesis." Journal of Biological Chemistry **272**(35): 21706-21712.
- Kawaide, H., T. Sassa, et al. (2000). "Functional analysis of the two interacting cyclase domains in ent-kaurene synthase from the fungus *Phaeosphaeria* sp L487 and a comparison with cyclases from higher plants." Journal of Biological Chemistry **275**(4): 2276-2280.
- Köksal, M., Y. Jin, et al. "Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis." Nature **469**(7328): 116-120.
- Köllner, T. G., J. Gershenzon, et al. (2009). "Molecular and biochemical evolution of maize terpene synthase 10, an enzyme of indirect defense." Phytochemistry **70**(9): 1139-1145.
- Köllner, T. G., M. Held, et al. (2008). "A maize (E)-beta-caryophyllene synthase implicated in indirect defense responses against herbivores is not expressed in most American maize varieties." Plant Cell **20**(2): 482-494.
- Köllner, T. G., P. E. O'Maille, et al. (2006). "Two pockets in the active site of maize sesquiterpene synthase TPS4 carry out sequential parts of the reaction scheme resulting in multiple products." Archives of Biochemistry and Biophysics **448**(1-2): 83-92.
- Köllner, T. G., C. Schnee, et al. (2004). "The variability of sesquiterpenes cultivars is controlled by allelic emitted from two *Zea mays* variation of two terpene synthase genes encoding stereoselective multiple product enzymes." Plant Cell **16**(5): 1115-1131.
- Köllner, T. G., C. Schnee, et al. (2008). "Protonation of a neutral (S)-beta-bisabolene intermediate is involved in (S)-beta-macrocarpene formation by the maize sesquiterpene synthases TPS6 and TPS11." Journal of Biological Chemistry **283**(30): 20779-20788.
- Korb, O., T. Stutzle, et al. (2006). PLANTS: Application of ant colony optimization to structure-based drug design. Ant Colony Optimization and Swarm Intelligence, Proceedings. M. Dorigo, L. M. Gambardella, M. Birattari, A. Martinoli and T. Stutzle. **4150**: 247-258.
- Krause, S. T., T. G. Koellner, et al. "Stereochemical mechanism of two sabinene hydrate synthases forming antipodal monoterpenes in thyme (*Thymus vulgaris*)." Archives of Biochemistry and Biophysics **529**(2): 112-121.
- Krieger, E., G. Koraimann, et al. (2002). "Increasing the precision of comparative models with YASARA NOVA - a self-parameterizing force field." Proteins-Structure Function and Genetics **47**(3): 393-402.
- Laemmli, U. K. (1970). "CLEAVAGE OF STRUCTURAL PROTEINS DURING ASSEMBLY OF HEAD OF BACTERIOPHAGE-T4." Nature **227**(5259): 680-&.
- Landmann, C., B. Fink, et al. (2007). "Cloning and functional characterization of three terpene synthases from lavender (*Lavandula angustifolia*)." Archives of Biochemistry and Biophysics **465**: 417-429.
- Laskowski, R. A., M. W. Macarthur, et al. (1993). "PROCHECK - A PROGRAM TO CHECK THE STEREOCHEMICAL QUALITY OF PROTEIN STRUCTURES." Journal of Applied Crystallography **26**: 283-291.

6 Literaturverzeichnis

- Lesburg, C. A., M. D. Lloyd, et al. (1995). "CRYSTALLIZATION AND PRELIMINARY-X-RAY DIFFRACTION ANALYSIS OF RECOMBINANT PENTALENENE SYNTHASE." Protein Science **4**(11): 2436-2438.
- Lichtenthaler, H. K., M. Rohmer, et al. (1997). "Two independent biochemical pathways for isopentenyl diphosphate and isoprenoid biosynthesis in higher plants." Physiologia plantarum **101**(3): 643-652.
- Lin, X. and D. E. Cane (2009). "Biosynthesis of the Sesquiterpene Antibiotic Albaflavenone in *Streptomyces coelicolor*. Mechanism and Stereochemistry of the Enzymatic Formation of Epi-isozizaene." Journal of the American Chemical Society **131**(18): 6332-+.
- Little, D. B. and R. B. Croteau (2002). "Alteration of product formation by directed mutagenesis and truncation of the multiple-product sesquiterpene synthases delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase." Archives of Biochemistry and Biophysics **402**(1): 120-135.
- Liu, J. G., C. R. Benedict, et al. (1999). "Purification and characterization of S-adenosyl-L-Methionine: Desoxyhemigossypol-6-O-methyltransferase from cotton plants. An enzyme capable of methylating the defense terpenoids of cotton." Plant Physiology **121**(3): 1017-1024.
- Lord, H. L., X. Zhang, et al. "In vivo solid-phase microextraction for monitoring intravenous concentrations of drugs and metabolites." Nature Protocols **6**(6): 896-924.
- Lynen, F., H. Eggerer, et al. (1958). "Farnesyl-pyrophosphat und 3-Methyl- Δ 3-butenyl-1-pyrophosphat, die biologischen Vorstufen des Squalens. Zur Biosynthese der Terpene, III." Angewandte Chemie **70**(24): 738-742.
- Martin, D. M., J. Faldt, et al. (2004). "Functional characterization of nine Norway spruce TPS genes and evolution of gymnosperm terpene synthases of the TPS-d subfamily." Plant Physiology **135**(4): 1908-1927.
- Nozaki, Y. (1972). "The preparation of guanidine hydrochloride." Methods in enzymology **26**: 43-50.
- Ojima, I., O. Duclos, et al. (1994). "SYNTHESIS AND BIOLOGICAL-ACTIVITY OF 3'-ALKYL-3'-DEPHENYLDOCETAXEL AND 3'-ALKENYL-3'-DEPHENYLDOCETAXEL." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters **4**(21): 2631-2634.
- Orth-Wagner, S., W. Ressin, et al. (1995). "Phytosedative for sleeping disorders containing extracts from valerian root, hop grains and balm leaves." Zeitschrift fur Phytotherapie **16**: 147-52.
- Peters, R. J., O. A. Carter, et al. (2003). "Bifunctional abietadiene synthase: Mutual structural dependence of the active sites for protonation-initiated and ionization-initiated cyclizations." Biochemistry **42**(9): 2700-2707.
- Peters, R. J. and R. B. Croteau (2002). "Abietadiene synthase catalysis: Conserved residues involved in protonation-initiated cyclization of geranylgeranyl diphosphate to (+)-copalyl diphosphate." Biochemistry **41**(6): 1836-1842.
- Peters, R. J. and R. B. Croteau (2002). "Abietadiene synthase catalysis: Mutational analysis of a prenyl diphosphate ionization-initiated cyclization and rearrangement." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **99**(2): 580-584.
- Peters, R. J., M. M. Ravn, et al. (2001). "Bifunctional abietadiene synthase: Free diffusive transfer of the (+)-copalyl diphosphate intermediate between two distinct active sites." Journal of the American Chemical Society **123**(37): 8974-8978.
- Petterson, E. F., T. D. Goddard, et al. (2004). "UCSF Chimera a visualization system for exploratory research and analysis." Journal of computational chemistry **25**(13): 1605-1612.
- Prisic, S., J. J. Xu, et al. (2007). "Probing the role of the DXDD motif in class II diterpene cyclases." Chembiochem **8**(8): 869-874.
- PyMol "The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3 Schrödinger, LLC."

6 Literaturverzeichnis

- Reardon, D. and G. K. Farber (1995). "The structure and evolution of alpha/beta barrel proteins." The FASEB journal **9**(7): 497-503.
- Ruzicka, L. (1953). "The isoprene rule and the biogenesis of terpenic compounds." Experientia **9**, 357-367
- Rynkiewicz, M. J., D. E. Cane, et al. (2001). "Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **98**(24): 13543-13548.
- Rynkiewicz, M. J., D. E. Cane, et al. (2002). "X-ray crystal structures of D100E trichodiene synthase and its pyrophosphate complex reveal the basis for terpene product diversity." Biochemistry **41**(6): 1732-1741.
- Sallaud, C., D. Rontein, et al. (2009). "A Novel Pathway for Sesquiterpene Biosynthesis from Z,Z-Farnesyl Pyrophosphate in the Wild Tomato *Solanum habrochaites*." Plant Cell **21**(1): 301-317.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989). "Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd edition." edn: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Schnee, C., T. G. Köllner, et al. (2002). "The maize gene terpene synthase 1 encodes a sesquiterpene synthase catalyzing the formation of (E)-beta-farnesene, (E)-nerolidol, and (E,E)-farnesol after herbivore damage." Plant Physiology **130**(4): 2049-2060.
- Schnee, C., T. G. Köllner, et al. (2006). "The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **103**(4): 1129-1134.
- Seemann, M., G. Z. Zhai, et al. (2002). "Pentalenene synthase. Analysis of active site residues by site-directed mutagenesis." Journal of the American Chemical Society **124**(26): 7681-7689.
- Shishova, E. Y., L. Di Costanzo, et al. (2007). "X-ray crystal structure of aristolochene synthase from *Aspergillus terreus* and evolution of templates for the cyclization of farnesyl diphosphate." Biochemistry **46**(7): 1941-1951.
- Starks, C. M., K. W. Back, et al. (1997). "Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase." Science **277**(5333): 1815-1820.
- Steele, C. L., J. Crock, et al. (1998). "Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*) - Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase." Journal of Biological Chemistry **273**(4): 2078-2089.
- Stipanovic, R., A. Bell, et al. (1999). "Cotton pest resistance: the role of pigment gland constituents." Biologically Active Natural Products: Agrochemicals: 211-220.
- SYBYL (2006). "SYBYL-[7.0] 1.2, Tripos International, 1699 South Hanley Rd., St. Louis, Missouri, 63144, USA."
- Szczesny, J. (2011). "Homologie Modelling und Katalysemechanismus von prenylierenden Enzymem aus *Zea mays* (Mais)." Diplomarbeit Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle.
- Thoma, R., T. Schulz-Gasch, et al. (2004). "Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase." Nature **432**(7013): 118-122.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, et al. (1994). "CLUSTAL-W - IMPROVING THE SENSITIVITY OF PROGRESSIVE MULTIPLE SEQUENCE ALIGNMENT THROUGH SEQUENCE WEIGHTING, POSITION-SPECIFIC GAP PENALTIES AND WEIGHT MATRIX CHOICE." Nucleic Acids Research **22**(22): 4673-4680.
- Trapp, S. C. and R. B. Croteau (2001). "Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications." Genetics **158**(2): 811-832.
- Trott, O. and A. J. Olson (2010). "Software News and Update AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking with a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading." Journal of computational chemistry **31**(2): 455-461.

6 Literaturverzeichnis

- Turlings, T. C., J. H. Tumlinson, et al. (1990). "Exploitation of herbivore-induced plant odors by host-seeking parasitic wasps." *Science* **250**(4985): 1251-1253.
- van der Hoeven, R. S., A. J. Monforte, et al. (2000). "Genetic control and evolution of sesquiterpene biosynthesis in *Lycopersicon esculentum* and *L. hirsutum*." *Plant Cell* **12**(11): 2283-2294.
- Vedula, L. S., D. E. Cane, et al. (2005). "Role of arginine-304 in the diphosphate-triggered active site closure mechanism of trichodiene synthase." *Biochemistry* **44**(38): 12719-12727.
- Vedula, L. S., J. Y. Jiang, et al. (2008). "Structural and mechanistic analysis of trichodiene synthase using site-directed mutagenesis: Probing the catalytic function of tyrosine-295 and the asparagine-225/serine-229/glutamate-233-Mg-B(2+) motif." *Archives of Biochemistry and Biophysics* **469**(2): 184-194.
- Wallach, O. (1885). "Zur Kenntnis der Terpene und der ätherischen Oele. ." *Annalen der Chemie* **227**, 277-302.
- Wani, M. C., H. L. Taylor, et al. (1971). "Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*." *Journal of the American Chemical Society* **93**(9): 2325-2327.
- Wendt, K. U., A. Lenhart, et al. (1999). "The structure of the membrane protein squalene-hopene cyclase at 2.0 angstrom resolution." *Journal of Molecular Biology* **286**(1): 175-187.
- Wendt, K. U., K. Poralla, et al. (1997). "Structure and function of a squalene cyclase." *Science* **277**(5333): 1811-1815.
- Whittington, D. A., M. L. Wise, et al. (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**(24): 15375-15380.
- Williams, D. C., D. J. McGarvey, et al. (1998). "Truncation of limonene synthase preprotein provides a fully active 'Pseudomature' form of this monoterpene cyclase and reveals the function of the amino-terminal arginine pair." *Biochemistry* **37**(35): 12213-12220.
- Yuan, J. S., T. G. Köllner, et al. (2008). "Molecular and genomic basis of volatile-mediated indirect defense against insects in rice." *Plant Journal* **55**(3): 491-503.
- Zeng, G. (1998). "Sticky-end PCR: New method for subcloning (vol 25, pg 206, 1998)." *Biotechniques* **25**(5): 788-788.
- Zerbe, P., A. Chiang, et al. "Mutational analysis of white spruce (*Picea glauca*) *ent*-kaurene synthase (*Pg* KS) reveals common and distinct mechanisms of conifer diterpene synthases of general and specialized metabolism." *Phytochemistry* **74**: 30-39.
- Zheng, H., M. Chruszcz, et al. (2008). "Data mining of metal ion environments present in protein structures." *Journal of inorganic biochemistry* **102**(9): 1765-1776.
- Zhou, K., Y. Gao, et al. (2012). "Insights into diterpene cyclization from structure of bifunctional abietadiene synthase from *Abies grandis*." *Journal of Biological Chemistry* **287**(9): 6840-6850.
- Zhou, K. and R. J. Peters (2009). "Investigating the conservation pattern of a putative second terpene synthase divalent metal binding motif in plants." *Phytochemistry* **70**(3): 366-369.

7 Anhang

7.1 Alignment im Bereich der Metallbindemotive

Tabelle I Multialignment von Sesquiterpensynthasen im Bereich der Metallbindemotive
 TPS10 aus B73 Mais wurde schwarz hervorgehoben.

AS	581	601	751	777
AAC24192	RFLFTKVACL	QTVLDDMYDT	YGTLDLDELKLF-	TELNSLISRL ADDTKTYKAE KARGEL-
AAK83562	RFLFTKVACL	QTVLDDMYDT	YGTLDLDELKLF-	TELNSLISRL ADDTKTYKAE KARGEL-
AAS47689	RFLFTKVACL	QTVLDDMYDT	YGTPESELKLF-	TELNSLISRL ADDTKTYKAE KARGEL-
AAX07266	RLLFTKVACV	ETVLDDMYDT	YGTLDLDELKLF-	MEQICLISRL ADDTQSYKAE KARGEL-
AAX07265	RFLFSKVACL	NTVLDDMYDT	YGTLDLDELKLF-	TELNSITRL ADDIHTYKAE KARGEL-
AAC05727	RIAFAKTAIL	CTVLDDLYDT	HATLHEIKIM-	LDLLELTGRI ADDLKDFEDE KERGEM-
AAK83561	RIAFAKTATV	CTILDDLYDT	HATLDELKIM-	QELSELTGRI TDDLKDFEDE KERGEM-
ABA86249	RIAFAKICTV	ATVLDDLYDT	HGMLDELKTV-	QELSELTRL IDDIRDFEDE KERGEI-
AAS47695	RITFAKISTL	MTILDDLYDT	HGTLEQLKIF-	HELVELTARL VDDSKDFETK KVGDEL-
AAC05728	RVAFTKIAIL	MTMLDDLYDT	HGTLDQLKIF-	HHLIELASRL VDDARDFQAE KDHGDL-
AAS47697	RLGFAKVCYL	GIVLDDIYDT	FGKMKLELELF-	NDLASSILRL RGDICGYQAE RSRGEE-
AAO61226	RLGFAKLCYL	GIVLDDIYDT	YGKMELELELF-	NDLASSILRL RGDICGYQAE RSRGEQ-
AAO18435	RTLWAKNGVL	TTIVDDFFDV	AGSKEELENL-	FKLMSTCGRL LNDVQTFERE YNEGKL-
AAO85539	RVITTMALIL	FTALDDMYDA	YGTMELELELF-	RVASEISRF TDDISSYEFH HKREHV-
ABE03980	RIIATKITLF	LVVLDDTYDA	YATIEEIRLL-	LQASELISRL QDDVMTYQFE RERQGS-
AAM21659	RIIATKITLF	LVVLDDTYDA	YATIEEIRLL-	LQASELISRL QDDVMTYQFE RERQGS-
AAM11626	RIIATKITLF	LVVLDDTYDA	YATIEEIRLL-	LQASELISRL QDDVMTYQFE RERQGS-
AAM11627	RIIATKITLF	LVVLDDTYDA	YATIEEIRLL-	LQASELISRL QDDVMTYQFE RERQGS-
AAM21658	RIIATKITLF	LVVLDDTYDA	YATIDEIRSI-	LKASELISRL QDDVMTFQFE RKRQGS-
AAL92481	RIIATKITLF	LVVLDDTYDA	YATIDEIRAI-	LKASELISRL QDDVMTFQFE RKRQGS-
CAA06614	RVMLVKTIAM	ISIVDDTYEA	YGTVDELAII-	LEGCVTICRV IDDIATYEVE KNRGQL-
AAC61260	RVMLVKTIAM	ISIVDDTYDA	YGTVDELAII-	LEGCVTICRV IDDIATYEVE KNRGQL-
AAF21053	RIMLAKTIAM	ISIVDDTFDS	YGTVKELDTY-	LKANATICRV IDDIATYEVE KSRGEI-
AAA19216	RVMLVKTIAM	ISIVDDTFDA	YGTVKLELAY-	LEASVICRV IDDTATYEVE KSRGQI-
AAP05761	RVMLVKTIAM	ISIVDDTFDA	YGTVKLELAY-	LEASVICRV IDDTATYEVE KSRGQI-
AAP05760	RVILVKTIAM	ISIVDDTFDA	YGTIKELETY-	LEASVICRV IDDTATYEVE KSRGQI-
AAP05762	RVMLVKTIAM	ISIVDDTFDA	YGTVKLELAY-	LEASVICRV IDDTATYEVE KSRGQI-
AAP79448	RVMLVKTIAM	ISIVDDTFDA	YGTVKLELAY-	LEANATLCRV VDDIATYEVE KGRGQI-
AAA86337	RVMLAKTIAM	ISIVDDTFDA	YGIVKLELEVY-	LEANVTLICRV VDDIATYEVE KGRGQI-
BAA82109	RVILAKTIAM	ISIVDDTFDA	YGIVKLELEVY-	LEANVTLICRV IDDIATYEVE KGRGQI-
BAA82108	RVMLAKTIAM	ISIVDDTFDA	YGIVKLELEVY-	LEANVTLICRV IDDIATYEVE KGRGQI-
AAS86321	RIMLTKTIAM	TAILDDTYDS	YGTLEELDVL-	AVATQITRV IDDIATYEVE KEKGQS-
AAK54279	RIFASKVVCV	ITTIDDTFDA	YGTFEELTLF-	LKATETIGRL MDDIAGYKFE QKRGHN-
AAQ04608	RKIMTQLNYI	LSIIDDTYDA	YGTLEELSLF-	VKAASVICRL MDDMQGHEFE QKRGHV-
ABX83200	RKMLTKVIAM	ASILDDIYDA	YGTFEELQVL-	IKASTIICRL MDDIASHKFE QEREHV-
AAU05952	RKILTKVIAM	TSIMDDIYDA	YGTFEELQLF-	LKASTTISRL MDDVVSZYKFE KEREHI-
AAV36464	RRIMTKVISL	ASVIDDIYDV	YGTIEELQLF-	VNASSKIARL MDDIVSNEFE QERGHG-
ABB01625	RKMMIKVITL	LSIIDDTYDA	YGTIDELLELF-	VNAAATLCRL MDDIVSSEFE QKRGHV-
AAR99061	RRILTKVIAM	TSVIDDIYDV	YGTPEELELF-	LKASEIICRL MDDIVSHKFE QKRGHV-
AAS66357	RRILTKVIAM	TSIIDDIYDV	YGTLEELELF-	VRASAIICRL MDDMVFHKFE QKRGHV-
ACF24768	RKIIIKVFTM	ISTIDDIYDA	YGTLELELELF-	IEASESVCRL MDDMRSHKFE QERGHV-
AAS66358	RRILTKVIAM	TSILDDIHDA	YGTPEELKLF-	MSSSNFITRL MDDIKSHKFE QKRGHV-
AAA93064	RKMLTKVIAM	ASIVDDTYDS	YATYEELIPY-	IQASTIICRF MDDVAEHKFK HRREDD-
CAA76223	RKMLTKVIAM	ASIVDDTYDS	YATYEELIPY-	IQASTIICRF MDDVAEHKFK HRREDD-
AAA93065	RKMLTKVIAM	ASIVDDTYDS	YATYEELIPY-	IQASTIICRF MDDVAEHKFK HRREDD-
AAC12784	RKMLTKVIAM	ASIVDDTYDS	YATYEELIPY-	IQASTIICRF MDDVTEHKFK HRREDD-
AAF74977	RKMLTKVIAM	ASIVDDTYDS	YATYEELIPY-	IQASTIICRF MDDVAEHKFK HRREDD-
CAA65289	RKMLTKVIAM	ASIVDDTYDS	YATYDELIPY-	IKASTIICRF MDDIAEHKFN HRREDD-
AAD51718	RKMLTKVIAM	ASIVDDTYDS	YATYEELIPY-	IQASTIICRF MDDVAEHKFK HRREDD-
AAG41889	RKMMTKVLNL	TSIIDDTFDA	YATFDELVTFF-	VRASALIARA MNDIVGHEDE QERGHV-
AAG41890	RKMMTKVLNL	TSIIDDTFDA	YATFDELVTFF-	VRASALIARA MNDIVGHEDE QERGHV-

7 Anhang

AAC39432	RKMMTKVLNL	TSI	IDDTFDA	YATFDELVTF-	VRASALIARA	MNDIVGHEDE	QERGHV-	
AAG41891	RKMMTKVLKM	TSI	IDDTFDA	YATFDELEPF-	VRASSLIARA	MNDIVGHEVE	QERGHV-	
AAG41892	RKMMTKVLKM	TSI	IDDTFDA	YANFDELVPF-	VRASSLIARA	MDDIVGHEVE	QERGHV-	
AAS86320	RMILVKVQCL	ISFL	DDTFDA	YGSFEELQLF-	MKAAITLARL	TNDIVGIELE	KERKHI-	
AAS86322	RNILVKVQCL	VSIF	DDTFDA	YGAFKELQLF-	ITASLALARL	SNDLVGIEFE	KERKYI-	
AAS86323	RMILAKGLAV	LSLM	DDVYDA	YGTFEELQMF-	IEATLI IARL	VNDITGHEFE	KKREHV-	
AAC31570	RIYLTKVLAL	LSIM	DDIYDT	YGIAEELQAF-	IKSSCLIGRL	LDDVASNEFE	HERKHV-	
AAX40665	RLIYSKVISL	VSIM	DDIYDN	YGTLEECRQL-	VEACCAIGRI	LNDITSYERE	QGRGDN-	
BAG12021	RVICKVFAF	LSIM	DDIYDN	YGILEECTLL-	VEACCVIGRL	LNDIRSHELE	QGRDHT-	
BAG12020	RVITSKAISL	MSIM	DDIYDN	YSTLEESRLL-	LKSCSIHCRL	MDDITSHQRE	QERDHF-	
ACC66281	RMIMTKMIAF	ATVM	DDTYDV	YGTLEEELELL-	LRTCSIVARL	MDDIPSNKLE	QERKHV-	
AAV63785	RIYLTKIISI	VAVID	DIYDV	YGSFDDLRSF-	LQVAEVLTRL	MDDIAGHGTE	KK-----	
AAV63786	RRFMTKVIAM	TSI	IDDIYDV	HGTLEELQRF-	LRAASVICRL	MDDVVGHGIE	QK-----	
CAB94691	RVFFTKAVAV	ITLI	DDTYDA	YGTYEELKIF-	FRYSGILGRR	LNDLMTHKAE	QERKHS-	
AAF61439	RVFFTKAVAV	ITLI	DDTYDA	YGTYEELKIF-	FRYSGILGRR	LNDLMTHKAE	QERKHS-	
AAF98444	RVFFTKAVAV	ITLI	DDTYDA	YGTYEELKIF-	FRYSGILGRR	LNDLMTHKAE	QERKHS-	
AAL79181	RIFLAKVISL	ATVL	DDTYDA	YGTYEELKIF-	IKASCAIARL	MDDIHSQKEE	KERIHV-	
CAC12732	RIFLAKVISL	ATVL	DDTYDA	YGTYEELKIF-	IKASCAIARL	MDDIHSQKEE	KERIHV-	
AAR31144	RIFLAKIITM	TAIL	NDTYDI	YGTYEELKIF-	ITASAYIGRI	LNDIVGHKEE	QQRKHI-	
AAR31145	RIFLTKVIKM	ATIL	DDTYDI	HGTYEELKIF-	IKASADVSRI	MDDIVGHKEE	QQRKHL-	
CAC36896	RIFLTKTIKM	AAIL	DDTYDI	YGTYEELKIF-	IKASSDISRI	MNDIVGHKEE	QQRKHI-	
AAF80333	RVFLSRFFSI	QTFL	DDTYDA	YGTYEELKIF-	VNACCLLCRT	MDDLGSHKGE	QDRKHV-	
CAC08805	RVFLSRFFSI	QTFL	DDTYDA	YGTYEELKIF-	VNACCLLCRT	MDDLGSHKGE	QDRKHV-	
CAC12731	RMFLMKTICM	LVVL	DDTFDN	YGTYEELKIF-	IKASCVIVRL	MDDIVSHKEE	QERGHV-	
AAX39387	RMFLMKTICM	LVVL	DDTFDN	YGTYEELKIF-	IKASCVIVRL	MDDIVSHKEE	QERGHV-	
ABX83201	RLIMTKIIAI	GSVL	DDIYDV	YGTFEELKLL-	LKASAIICRL	MNDIVSHKFE	QERGHV-	
AAU05951	RLIMTKVIAI	GSML	DDIYDV	YGTFEELKLL-	LKASAVICRL	MNDIVSHKFE	QERGHV-	
AAB95209	RMGLAKGVLI	CGIM	DDTYDN	YATLNEAQLF-	ATSTAMIGRY	WNDTSSQLRE	SKGGEM-	
CAH10289	RMGLAKGVLI	CGIM	DDTYDN	YATLNEAQLF-	ATSTAMIGRY	WNDTSSQLRE	SKGGEM-	
CAH10288	RMGLAKGILI	IGIM	DDTYDN	YATLNEAQLF-	ATSTGMIGRY	WDDIGSHLRE	SKGGEM-	
AAV63787	RKGVVLSIKI	IGIL	DDTYDN	YATVNEAQLF-	AVKAGLIGRY	WDDIGSHKRE	SKGGEM-	
AAS86319	RMIAAKLIQI	AAAV	DDTYDN	YATIREAQLL-	ASSTAIVMRC	CNDLGSNQRE	SKGGEV-	
ABJ16554	RMIFAKRQML	FSL	DDTYDV	RATLEEARKF-	GRAFAEVARF	MDDLAASHSG	RDKMDV-	
ABB73046	REIMTKIAVL	ITIT	DDIYDI	YGALKEELQEF-	IRWPSMVLRL	ADDLGTSSSE	IKRGDV-	
AAV63788	RMHLMKIGAY	ITLL	DDIYDV	YGTLEELQVL-	L---SMILRL	ADDLGTSSSE	MKRGDV-	
AAO22848	RICLTKVINL	VLII	DDVYDI	YGSEELKHF-	LYNISLIVRL	NNDLGTSAAE	QERGDS-	
EU596452	RIILTKMTAF	ITIL	DDIFDT	YATTEESMML-	IKSYTTCVRL	SNDIASTKRE	QAGDHY-	
AAX99146	RVIATKMTAL	ITVL	DDMMDT	YSTTEEAMLL-	AKSLMNI	SRL LNDTASTKRE	QNAGQH-	
AAS88571	RIILTKITGL	ITII	DDMFDT	HGTTEDCMKF-	IRTFGSFVRL	SNDVVESTKRE	QTKDHS-	
AAS88572	RIILTKITGL	ITII	DDMFDT	HGTTEDCMKF-	IRTFGSFVRL	SNDVVESTKRE	QTKDHS-	
AAS88575	RIILTKITGL	ITII	DDMFDT	HGTTEDCMKF-	IRTFGSFVRL	SNDVVESTKRE	QTKDHS-	
AAS88574	RIILTKITGL	ITII	DDMFDT	HGTTEDCMKF-	IRTFGSFVRL	SNDVVESTKRE	QTKDHS-	
AAS88576	RIILTKIVAF	ITIL	DDTLDS	HATSCESMQL-	VKSFGIFVRL	SNDIVSTKRE	QREKHC-	
AAT70085	RIILTKIVAF	ITIL	DDTLDS	HATSCESMQL-	VKSFGIFVRL	SNDIVSTKRE	QREKHC-	
ACF58240	RIILTKIVAF	ITIL	DDTLDS	HANSYESMQL-	VKSFGIFVRL	SNDIVSTKRE	QREKHC-	
ABY79206	RIILTKIVAF	ITIL	DDTLDS	HANSYESMQL-	VKSFGIFVRL	SNDIVSTKRE	QREKHC-	
EU596454	RTMLTKLFIF	VSIF	DDIYDN	YSTLEESKLF-	ITSSCIVGRL	LNDIASHERE	QGSSSSS	
ABJ16553	RTMLTKLFIF	VSIF	DDIYDN	YSTLEESKLF-	ITSSCIVGRL	LNDIASHERE	QGSSSSS	
ABY79209	RKMLTQLFMI	VSVL	DDLYDS	HCTTEEGNTF-	VRAVCI IARL	ANDIMSYKRE	-ASNNTM	
ABY79214	RKMLTQLFMI	VSVL	DDLYDS	HCTTEEGNTF-	VRAVCI IARL	ANDIMSYKRE	-ASNNTM	
ABY79211	RKMLTRLFMI	VSVL	DDLYDS	HCTTEEGNAF-	VRAVCI IARL	ANDIMSYKRE	-ASNNTM	
ABY79212	RKMLTQLFMI	VSVL	DDLYDS	HCTTEEGNAF-	VRAVCI IARL	ANDIMSYKRE	-ASNNTM	
ABY79213	RKMLTQLFMI	VSVL	DDLYDS	HCTTEEGNAF-	VRAVCI IARL	ANDIMSYKRE	-ASNNTM	
ABY79210	RKMLTQLFMI	VSVL	DDLYDS	HCTTEEGNAF-	VRAVCI IARL	ANDIMSYKRE	-ASNNTM	
AAX59990	RIMS AKLYLV	ITFL	DDACDT	YGSISEVESL-	VRILGAKTRL	MDDIADFEED	MEKGYT-	
NP_193064	RVIAAKFNYL	LTIL	DDACDH	YFSIHLETRL-	IKSLAAKGR	L	MDDITDFDSD	MSNGFA-
NP_193066	RVIAAKFNYL	LTIL	DDACDH	YFSIPELTRL-	IKSLAAKGR	L	MDDITDFESD	MSNGFA-
ABR24417	RIELTKSITF	IYLI	DDIFDV	YGSPEELVIF-	MSSVATILRL	WDDLGS AKDE	HQDQKD-	
AAV36466	RIELTKPLSL	IYII	DDIFDF	YGNIDELTLF-	ISTTAKILRL	CDDLEGD KDV	NCEGND-	

Rot > 90%

Schwarz 50%-90%

Blau <50%

7.2 DNA-Sequenz

B73-TPS2 (Accession-Nummer:)

```
ATGTACTCTCTACCAGGAGCAACCATGTCTGCTGCACCTGCAAGCATCATCTCTTCTTCTCCTTCGTTGGAGC
CTCTTCTCCTTGCAGCAGCTTCGCCGGCGGGCAGCGGCAGCTGCAAACAGCCACCACCAAGTCCGCCA
GCGCGGCCACTTGGTCCGTACTTTGGCGGCATCATCGTCTGCCAACACGCTGCTGCGGAGTGACTTCGATC
TCCAGGAGGGCCTGACGACGGACGTCAAACGGATGCTGCGTACGCGTCAGAAGAAGAGCGGCGGGCGGC
GGGAGATGCTGGTACCATCGACAACCTCAAGCGCCTCTGCATCGACCACTACTTCGAGGAAGAGATCGAG
GGCGCCATGGCGACGGGCGCCTGCACGCGTCTCCTCCACAGCGACGACCTCTTCGACGCAACCCTCGCGT
TCAGGCTCCTGAGAGAGGCAGGACACGATGTCTCAGCAAAAGACGATGTTCTACGCAGGTTTCATCGACGGC
GCCAGCGGCCACTTCAAGCTATCTCTGAGCAACGACGTGAGAGGGCTCCTGAGCCTGCACGACATGTCCCA
CCTGGACGTGGGAGGGGAGGCGGCGCTGCTCCACAGGGCCAAGGAGTTCGAGCAGGCACCTCGCGTC
CGCCGTACGGTACCTGGACGACCCTAGCCTCGCGGAGTACGTGCGGCAGTCCCTGGACCACCCGTACCAC
CTCAGCCTGACGCAGTACAAGGCCAGGCAACACCTCCGCTACCTGCAGAGCCTGCCCTCCAGAGACGCCGC
CGTGGAGAGACTCGCAGTTGCCGAGTTCCAGCTCAACAAGTCGCTGCATCAGGGAGAGATGCGAGAGATTA
AAAGGTGGTGGATGGACCTAGGGTTGGCTGAAGAAATACCTGTGGTGCGGGATCAGGTGATGAAATGGTAC
ATGTGGTCCATGCGAGCCCTCCAAGGATCTTCTTCTCCAGATACCGGGTTCGAGATACCAAGATAATCTCG
CTTGTTCACGTCGTCGACGACATATTCGACCTCGTTGGCACCCTGGAGGAGCTCTCCGCCTTACCGAGGCA
GTCAAATGTGGGACTGTGGCTGCTGATTCACCTCCAGTTGCAATGAGATCATGCTATAAGGCCCTCCAC
ACCGTTACGAACGAGATCGCAGAGATTGCCAGAGAAGGAGCATGGATCTAACCATGTCAATCGTCTTAGGAAA
GCATGGCGGTGTTGTTGACGGTTTTCATGGTTGAGGCGAGATGGCTAGCGACCGACCAAGTCCCTACGGCG
GAGGACTACCTACGAAACGGCGTCATCACAACAGGAGTGCCTCACAATTTATGCACATAATCAGCATGCTA
GGGTATGATGACCCAAGCACCGAGGAAGAAGAAGGCGATCATCGACCACATGCCCTCAATCATCTCCTG
CCCAGCCAAGATCCTCAGGCTCTGGGATGACATGGGCAAGCGAGAGGATGAGGCTCAGGAAGGATTGAT
GGGTCGTACAGGGACTTCTACCTCATGGAGAACCCTAGCCGCAGCCCCGGCGAGGCGGAAGCGCACATGC
CGGCCTCATCGCGAGGGAGTGGGAGGTGCTCAACAGGGAGTGTCTTCTGCAGGAGGACCTTCCCCTCGAA
CCTCGTCAGGTGCTTGAACACCGGAGGATGGTCAGCGTACTCGTACAACAAGGAGCAGAGGC
TTCCCGTCCCTCGAGGACTACGCGGCGATGATGTTGGTGCCTTTGA
```

tps4 - B73 (Accession-Nummer: AY518310)

```
ATGGCGTCTCCTCCAGCACATCGTTCCAGCAAGGCAGCTGATGAGGAGCTGCCAAAGGCTTCTTCGACCTTT
CACCCAAGTCTGTGGGGCAGTTTCTTCTGACCTACCAGCCGCCAACTGCACCTCAGCGAGCAAACATGAAA
GAACGAGCTGAGGTTTTAAGAGAACGTGTTAGGAAGTTTTGAAGGGCTCGACGACTGATCAACTACCAGAA
ACAGTGAATCTTATATTAACATTGCAAAGACTTGGACTGGGTTACTACTACGAGAACGAGATAGACAAGTTGC
TGCACCAAATTTACAGCAACTCCGATTACAATGTGAAAGATCTTAACTTGGTTTCGACGCGGTTCTACCTTCT
CGAAAGAACGGCTACGATGTGCCATCAGATGATTTCTGAGCTTCAAACAGAAGAAGGCGGCTTCGCCTGT
GCTGCTGCTGACACGAGAAGCTTGTAAAGCTTATAAACGCAGCATATCTGAGGAAGCATGGAGAGGAGGTA
CTAGACGAAGCGATTTTCATCGACTAGACTCCGCCTCCAAGATCTCCTTGGACGACTTCTTCCAGAAATGCCA
TTTGCAAAGGAGGTGTCTTCTTCCCTTCTGACCCCTCTCTTCAAGAAGGTTGGGATACTAGAAGCGAGAAAC
TACATACCCATTTACGAAACGGAGGCGACGCGAAACGAAGCCGATTTGGAGCTTGCGAAACTGAAATTTAAC
CTTCAGCAACTTTGATTTCTGTGAAGAGCTAAAGCATGCTCAGCGTGGTGGAAACGAGATGATAGCCAAATCA
AAGCTGACCTTTGTTAGAGATAGAAATGTAGAGGAGTATTTCTGGATGAATGGAGCATGCTATGATCCGCCGT
ACTCCCTTTCCCGAATTATACTGACAAAGATCACGGGACTTATTACAATAATCGATGATATGTTTGATACACAT
GGTACCCTGAAGATTGATGAAATTCGCTGAAGCGTTTGGCAGATGGGACGAAAGTGAATACATCTCCTT
CCAGAGTACATGAAGGATTTCTACATATTTGATGTTGGAGACATTTAGTCAATTTGAGGATGCTTTAGGGCCAG
AGAAGAGCTACCGTGTGCTTTACCTAAAACAGGCGATGGAGCGTTTGTGAGCTATACTCCAAGGAAATAA
AATGGCGTGATGATGATTAATGTGCCGACAATGAGTGAACACCTCCAGGTTTCAGCAGAGACCATCGCAACCA
TTGCTCTAACATGTTCTGCATATGCTGGGATGGGTGATATGTCGATAAGAAAGGAGACCTTCGAGTGGGCTT
TGAGCTTTCTCAATTTATAAGAATTTTGGTTCAATTTGTACGGCTCTCCAACGATGTGATCGACCAAGCGT
GAGCAAACAAAAGACCATAGTCCCTCCACTGTCCATTGTTACATGAAGGAGCATGGAACGACCATGGACGAT
GCATGTGAAAAGATAAAGGAGCTTATCGAAGATTCATGGAAGGATATGCTAGAGCAATCCCTTGCCTGAAA
GGGCTCCCAAAGGTTGTCCACAGCTAGTGTGTTGACTTCTCAAGAACCACGGATAATATGTACAGGGATCGT
GACGCAATGACCTTTCGGAAGCACTCAAGGAAATGATACAGCTACTGTTTGTGGAGCCAATACCCGAATGA
```

7 Anhang

tps10 - B73 (Acesion-Nummer: AAX99146)

ATGGATGCCACCGCCTTCCACCCAAGTCTGTGGGGCGATTTCTTCGTGAAGTACAAGCCTCCAACCGCGCC
CAAGCGTGGACACATGACGGAAAGAGCCGAGCTGTAAAGAAGAGGTTTCGCAAAACGCTCAAGGCGGCTG
CAAACCAGATAACAAATGCTTTAGATCTTAATCACACTGCAGAGGCTTGGGCTGGACCACCACTACGAGAA
TGAGATCAGCGAGCTGCTGCGCTTTGTCTACAGCAGTTCGGATTACGACGATAAAGACCTGTATGTAGTCTC
GCTGAGGTTTTATCTTCTGCGGAAACATGGCCAATTGTGTTTCATCAGATGTCTTTACGAGTTTTAAAGACGAG
GAAGGGAAC TTCGTGGTGGATGATACGAAATGTCTCTTGAGCTTATACAAATGCAGCGTACGTTAGGACTCAC
GGGGAGAAAGTACTCGACGAAGCCATTACCTTCACCAGACGCCAGCTTGAAGCTTCATTA TTAGATCCACTG
GAACCAGCATTAGCAGATGAAGTACATCTCACCC TTCAAACCCCACTCTTCCGAAGGCTTAGGATACTGGAA
GCAATAAACTATA TCCCAATA TATGGGAAAGAAGCTGGACGAAACGAGGCCA TATTAGAGCTTGCAAAGCTG
AATTTCAACCTTGCTCAGCTTATTTACTGTGAGGAGTTGAAAGAGGTTACACTATGGTGAAGCAGCTTAATG
TTGAGACAAACTTGAGTTTCA TTCGAGACAGAATCGTAGAATGTCA TTTCTGGATGACAGGCGCGTGTGTGA
ACCACAGTATTCTCTTTACGGGTCA TAGCTACGAAGATGACAGCCTTGATCACC GTATTAGATGACATGATG
GACACCTACAGCACA ACTGAGGAGGCCATGCTCCTTGCTGAAGCAATATACAGATGGGAAGAGAATGCCGC
AGA ACTACTTCCAAGATACATGAAAGATTTCTATCTCTACTTACTGAAGACAATTGATTCGTGTGGGGATGAAC
TAGGACCAAACAGAAGCTTCCGGACATTTTATCTCAAAGAGATGCTAAAGGTGTTAGTCCGAGGAAGCTCTC
AAGAGATAAAATGGCGTAATGAAAATTACGTCCCAAAAACAATCAGTGAACACTTAGAACATTCAGGACCAAC
GGTGGGAGCCTTTCAAGTAGCATGTTCTTCATTTGTTGGGATGGGTGACAGCATAACAAAGGAAAGTTTTGA
GTGGCTTTTGACATATCCAGAACTTGCCAAGTCTTTGATGAATATTTACGACTCTTGAATGATACTGCATCAA
CAAAGCGTGAGCAAAATGCGGGGCAGCATGTGTCCACGGTCCAATGTTATATGTTGAAGCATGGGACAACAA
TGGATGAAGCATGTGAGAAGATAAAAAGAGTAACTGAAGACTCATGGAAGGATATGATGGA ACTCTATCTTAC
ACCAACAGAACATCCAAA ACTCATCGCACAAACAATCGTTGATTTTGCAAGGACAGCGGACTACATGTACAAG
GAAACAGACGGATTTACTTTTTCACACACAATCAAAGATATGATAGCAAAACTCTTTGTGGATCCAATATCATT
ATTCTAG

Danksagung

Jeder der eine wissenschaftliche Schrift zu Papier bringt macht sich wahrscheinlich recht tief sinnige Gedanken über das Wie und Wer einer Danksagung. Man steht am Ende eines langen Weges und rekapituliert über die Weggefährten. Wer hatte auf einen Selbst positiven Einfluss wer negativen, wer half einem so manches Tal zu durchschreiten, zeigte einem neue Wege, wer feierte die Erfolge und beruhigte die frustrierenden Situationen. Daher möchte ich außerhalb der Form in erster Linie Frau Dr. Claudia Schaff (geb. Lenk) danken.

Ratschläge, Hilfestellung, viel Besonnenheit und Geduld sind die Eigenschaften die ich an Herrn Prof. Degenhardt schätze. Sie halfen um manche Klippe zu schiffen und dabei einen kühlen Kopf zu bewahren. Daher möchte ich mich bei Herrn Prof. Degenhardt für die Betreuung und die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit, unter Berücksichtigung der oben genannten Eigenschaften, bedanken.

Privat zur Ruhe zu kommen, sich mahnend aber wohl dosiert gegen den Schlendrian zu stellen, verdanke ich meinen Eltern. Ebenso soll die korrektive Leistung und Hilfestellung bei der Erstellung der Arbeit erwähnt werden. Vielen lieben Dank für die vielen schönen Stunden, die viele Hilfe im Alltag und die Freiheit, mich nach meinen Wünschen entfalten zu können. Das ist nicht selbstverständlich!

Was ist ein Labor ohne Technische Assistenten? Dieser staubigen Bezeichnung hauchten Frau Thomasch, Frau Kunth, Frau Danders und Frau Wodak Leben ein. Lebendig ging es wahrlich zu und früh wurde man zur Ordnung gerufen, wenn Konfusion drohte die Kontrolle zu erlangen. So erdeten sie schon manchen Doktoranden und trugen ganz nebenbei zur Auflockerung des Alltags bei. Hervorzuheben sind die kurzen Wege auf die sie mich führten, ob es nun Hilfestellungen, Ratschläge oder wenn es etwas zu organisieren gab. Auf sie ist Verlass!

Was macht ein Labor noch aus? Richtig, die Arbeitsgruppe. Die Arbeitsgruppe, wie weitreichend dieser Begriff bei längerer Überlegung doch ist. Es ist schwer in Worte zu fassen was dieses Konglomerat für einen bedeutet. Doch eines steht fest. Alle Erlebnisse bereicherten mein Leben und förderten den Charakter. Hervorheben möchte ich in diesem Zusammenhang Frau Sandra Krause, welche mir mit ihrer Klugheit so manch andere Seite der Medaille zeigte und das eindimensionale Denken meinerseits abbaute. Dafür danke ich ihr.

Marko Walkowiak

Wissenschaftliche Publikationen und Vorträge

Posterpräsentationen:

„Single AA in the active center of the maize multiproduct terpene synthase TPS10 affect deprotonation and formation of cyclic sesquiterpenes” Terpnet 2011 Kalmar Schweden

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Name: Walkowiak
Vorname: Marko
Geburtsdatum: 05. Oktober 1982
Geburtsort: Blankenburg
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1989-1991 Grundsule „Käthe Kollwitz“
1992-1993 Grundsule „Geschwister Scholl“
1993-2002 Europagymnasium Richard v. Weizsäcker

Studium:

2003-2007 Studium der Pharmazie,
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
12/ 2008 Approbation als Apotheker

Tätigkeiten:

02/2009-01/2013 Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Abteilung
Molekulare Biotechnologie des
Fachbereichs Pharmazeutische Biologie zum
Thema : Molekularbiologische und
Strukturchemische Betrachtung der
Biosynthese von Komplexen
Sesquiterpengemischen im Speziellen der
Terpensynthese 10 in Mais

Halle, im November 2014

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass:

- mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät bekannt ist,
- ich die vorliegende Dissertation selbst angefertigt habe und alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in der Arbeit angegeben sind,
- ich alle Personen, die mich bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben, benannt habe,
- ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen habe,
- Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,
- ich die vorliegende Arbeit nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe,
- ich diese Arbeit, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Halle, Im Dezember 2014

Marko Walkowiak