

**Kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen aus Pflanzen:
Anwendungsbezogene Untersuchungen zu
Cosubstratpräferenz und Reduktion bizyklischer Diketone**

Dissertation

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

der Naturwissenschaftlichen Fakultät I

-Biowissenschaften-

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau M.Sc. Sabrina Schläger

geb. am 24.03.1987 in Hildesheim.

Gutachter/in:

1. Prof. Dr. Birgit Dräger
2. Prof. Dr. Milton T. Stubbs
3. Prof. Dr. Andreas Kirschning

Halle (Saale), den 24.08.2017

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	I
	Abbildungsverzeichnis	VI
	Tabellenverzeichnis	X
1	Einleitung	1
1.1	Enzyme als Biokatalysatoren in der Wirkstoffherstellung	1
1.2	Ketoreduktasen in der chemischen Synthese	1
1.3	Kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen	4
1.4	Tropinonreduktasen und Tropinonreduktase-ähnliche Enzyme	9
1.5	Zielsetzung der Arbeit	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	<i>Escherichia coli</i> Stämme	14
2.1.2	Klonierungsvektoren	14
2.1.3	Rekombinante Plasmide	14
2.1.4	Oligonukleotid-Primer	15
2.1.5	Kultivierungsmedien für <i>E. coli</i>	16
2.1.6	Chemikalien	16
2.1.7	Geräte und Software	16
2.2	Methoden	17
2.2.1	Transformation und Kultivierung von Bakterien	17
2.2.1.1	Transformation kompetenter Zellen	17
2.2.1.2	Kultivierung von Bakterien	17
2.2.2	Isolation, Trennung und Reinigung von DNA	17
2.2.2.1	Trennung von DNA-Fragmenten über Agarosegelelektrophorese	17
2.2.2.2	Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und aus Lösungen	18
2.2.2.3	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	18
2.2.2.4	Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit	18
2.2.3	Enzymatische Modifikation von DNA	19
2.2.3.1	Mutagenese-Polymerase Kettenreaktion	19
2.2.3.2	Herstellung der chimären Gene	19
2.2.3.3	Sequenzanalyse zur Überprüfung der Plasmid-DNA	22
2.2.4	Biochemische Methoden	22
2.2.4.1	Heterologe Proteinproduktion in <i>E. coli</i>	22
2.2.4.2	Proteinreinigung mittels immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie	22
2.2.4.3	Umpufferung und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen	24
2.2.4.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen	24
2.2.4.5	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	25
2.2.4.6	Massenspektrometrie/Proteomik	26
2.2.4.7	Analytische Ultrazentrifugation und Analytische Gelfiltration	26

2.2.5	Messung der Enzymaktivität	29
2.2.5.1	Prinzip der Messung	29
2.2.5.2	Konzipierung der Messung	30
2.2.5.3	Lösungen	31
2.2.5.4	Bestimmung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Substrat- und Cosubstratkonzentration	32
2.2.5.5	Standardassays für die Aktivitätsmessungen	32
2.2.5.6	Aktivitätsmessung der Enzymvarianten	33
2.2.5.7	Ermittlung der pH- und der Temperaturabhängigkeit	33
2.2.5.8	Messung der Aktivität mit den Diketonen	33
2.2.5.9	Ermittlung der enzymkinetischen Parameter	34
2.2.6	Stabilitätstest für NADH und NADPH	34
2.2.7	Chemische und biokatalytische Synthese der Referenzsubstanzen	35
2.2.7.1	Säulen- und Dünnschichtchromatographie	35
2.2.7.2	NMR-Spektroskopie und hochauflösende Massenspektrometrie	35
2.2.7.3	Festlegung der Nummerierung	36
2.2.7.4	Chemische Synthese der Referenzsubstanzen	36
2.2.7.5	Biokatalytische Synthese der α,β -ungesättigten Hydroxyketone	42
2.2.8	GCMS-Analytik der biokatalytischen Produktbildung	43
2.2.8.1	Qualitativer Produktnachweis	44
2.2.8.2	Semiquantitativer Produktnachweis	44
2.2.8.3	Biokatalytische Ansätze und Vermessung der Proben	45
2.2.9	Kristallisation	45
2.2.9.1	Screening von Kristallisationsbedingungen im 96-Well-Maßstab	45
2.2.9.2	Fine screening der Kristallisationsbedingungen	47
2.2.9.3	Kryoschutz und Liganden-Soaking	47
2.2.9.4	Datensammlung- und prozessierung	48
2.2.9.5	Strukturlösung und Verfeinerung	48
2.2.10	Methoden der Bioinformatik	48
2.2.10.1	Konformationsberechnung der Diketone	49
2.2.10.2	Docking mit MOE	49
2.2.10.3	Docking mit GOLD	49
3	Ergebnisse	51
3.1	Optimierung der Cosubstratpräferenz der Tropinonreduktase-ähnlichen Enzyme aus <i>A. thaliana</i> und von CoTR aus <i>C. officinalis</i> durch gerichtete Mutagenese	51
3.1.1	Änderung der Cosubstratpräferenz von At2g29350	51
3.1.2	Änderung der Cosubstratpräferenz von CoTR und At2g29360	56
3.1.3	Proteinproduktion und Aufreinigung der Enzymvarianten	58
3.1.4	Charakterisierung der Enzymvarianten	59
3.1.4.1	pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität	59
3.1.4.2	Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität	61

3.1.4.3	Cosubstratstabilität in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert	61
3.1.4.4	Kinetische Parameter für die enzymatische Umsetzung von Substrat und Cosubstrat	62
3.1.4.5	Bestimmung des nativen Molekulargewichts	66
3.2	Änderung der Cosubstratpräferenz von At2g29350 durch die Bildung von Chimären	70
3.3	Identifizierung anwendungsrelevanter Substrate	75
3.3.1	Ermittlung anwendungsrelevanter Substrate anhand des Pharmacophoren-Screenings	75
3.3.2	Bizyklische Diketone als Substrate	76
3.3.3	Analytik der Produktbildung der biokatalytischen Umsetzung der Diketone	77
3.3.3.1	Mögliche Produktbildung durch die Enzyme	77
3.3.3.2	Chemische Synthese der Referenzsubstanzen	78
3.3.3.3	Biokatalytische Herstellung der diastereomeren α,β -ungesättigten Hydroxyketone	83
3.3.3.4	Produktbildung aus der biokatalytischen Reduktion der bizyklischen Diketone	85
3.3.4	Kinetische Charakterisierung der biokatalytischen Umsetzung der bizyklischen Diketone	93
3.4	Kristallisation von CoTR und At2g29350	96
3.4.1	Kristallisationsbedingungen	96
3.4.2	Kristallstrukturen von CoTR	98
3.4.3	Detaillierte Analyse der Kristallstruktur von CoTR	102
3.4.3.1	Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur	102
3.4.3.2	Cosubstrat- und Substratbindetasche	106
3.5	Docking der Diketone in die Kristallstruktur von CoTR	112
3.5.1	Docking mit MOE	112
3.5.2	Docking mit GOLD	115
3.6	Erster Ansatz zur Optimierung der Produktbildung von CoTR und CoTR(S27A,A49D)	117
4	Diskussion	121
4.1	Optimierung der Cosubstratpräferenz von SDR-Enzymen	121
4.2	Dimer-Tetramer-Gleichgewicht von At2g29350(S26A,A48D) und At2g29350	127
4.3	SDR-katalysierte Reduktion bizyklischer Diketone	132
4.4	Kristallstruktur von CoTR im Vergleich zu den Homologiemodellen und den Kristallstrukturen der Tropinonreduktasen I und II	137
4.5	Mechanismus der Substratbindung und Produktbildung	145
4.6	Beurteilung der allgemeinen Eigenschaften der Enzyme für ihre Anwendbarkeit als Biokatalysatoren	148

5	Zusammenfassung	151
6	Anhang	153
6.1	Material	153
6.2	Methoden	154
6.3	Ergebnisse	162
6.3.1	Proteinproduktion, -reinigung und -ausbeute	162
6.3.2	Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert	164
6.3.3	Stabilitätstest für die analytische Ultrazentrifugation und Gelfiltration	165
6.3.4	Produktanalyse mittels GCMS	166
6.3.5	Kurvenverläufe der kinetischen Charakterisierung	170
6.3.6	Sequenzalignment der relevanten Proteine	173
6.3.7	Homologiemodelle	174
6.3.8	Kristallstruktur von CoTR	176
6.4	Diskussion	184
6.5	Analytik der Referenzen	186
6.6	Spektrenanhang	194
6.6.1	EI-Spektren	194
6.6.2	NMR-Spektren	202
7	Literaturverzeichnis	226
	Publikationen und Tagungsbeiträge	
	Lebenslauf	
	Danksagung	
	Erklärung an Eides statt	

Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Äq.	Äquivalent
As	Aminosäure
At	<i>Arabidopsis thaliana</i>
BH ₃	Monoboran
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
°C	Grad Celsius
CDCl ₃	deutერიertes Chloroform
CG1	Chimäres Gen 1 (Bezeichnung für Gen und Protein)
CG2	Chimäres Gen 2 (Bezeichnung für Gen und Protein)
cm	Zentimeter
Co	<i>Cochlearia officinalis</i>
CPP	Citrat/Phosphat-Puffer
d	Schichtdicke oder Tag
Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat

DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
<i>dr</i>	diastereomeric ratio, Diastereomerenverhältnis
Ds	<i>Datura stramonium</i>
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ϵ	Extinktionskoeffizient
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EG	Ethylenglycol
EI	electron impact, Elektronenstoß
Et	Ethyl
EtBr	Ethidumbromid
Et ₂ BOMe	Diethylmethoxyboran
Et ₂ O	Diethylether
EtOAc	Essigsäureethylester
EtOH	Ethanol
GCMS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GNP	Glycin/NaOH-Puffer
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His-Tag	Hexahistidin-Anhang
H ₂ O	Wasser
HPK	Hajos-Parrish-Keton
HRMS	hochauflösende Massenspektrometrie
Hz	Hertz

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k. A.	keine Angabe
kat	Katal (1 kat = 1 mol/s)
k_{cat}	Wechselzahl, katalytische Konstante
KCl	Kaliumchlorid
K_2HPO_4	Dikaliumhydrogenphosphat
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
K_i	Dissoziationskonstante
K_m	Michaelis-Menten Konstante
konz.	konzentriert
KPP	Kaliumphosphatpuffer
L	Liter
λ	Wellenlänge
LiAlH_4	Lithiumaluminumhydrid
LOD	limit of detection, Detektionslimit
LOQ	limit of quantification, Quantifizierungslimit
m	Masse
M	Molarität (mol/L) oder molare Masse (g/mol bzw. Da)
mA	Milliampere
Me	Methyl
Mes	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
mg	Milligramm
mL	Milliliter
μL	Mikroliter

μM	Mikromolar
μg	Mikrogramm
3MCH	3-Methylcyclohexanon
3MCHol	3-Methylcyclohexanol
MeOH	Methanol
MgCl_2	Magnesiumchlorid
MgSO_4	Magnesiumsulfat
min	Minute
n	Anzahl der technischen Replikate oder Stoffmenge
NaBH_4	Natriumborhydrid
NaCl	Natriumchlorid
NaCO_3	Natriumcarbonat
NAD(H)	Nicotinamidadenindinukleotid (reduziert)
NADP(H)	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduziert)
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
ng	Nanogramm
nL	Nanoliter
nm	Nanometer
NMR	nuclear magnetic resonance, Kernspinresonanzspektroskopie
OD_{600}	Optische Dichte bei 600 nm
PCR	polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglycol
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
Piv	Pivaloyl
pKa	Säuredissoziationskonstante

ppm	parts per million, "Teil von einer Million"
Priv.-Doz.	Privatdozent
<i>p</i> -TsOH	<i>para</i> -Toluolsulfonsäure Monohydrat
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SL	Stammlösung
SV	Säulenvolumen
Tab.	Tabelle
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -Butyl
TBS	<i>tert</i> -Butylsilyl
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
THP	Tris/HCl-Puffer
t_{ret}	Retentionszeit
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (1 U = 1 μ mol/min)
UV	ultraviolettes Licht
V	Volumen oder Volt
vergl.	vergleiche
VIS	visible, sichtbarer Bereich des Lichtspektrums
V_{max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit, maximale spezifische Aktivität
WMK	Wieland-Miescher-Keton

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Beispiele für die industrielle Anwendung von Kettoreduktasen in Wirkstoffsynthesen.	2
Abb. 1.2	Beispiele für Cosubstrat-Recycling-Systeme bei der Anwendung von Kettoreduktasen.	4
Abb. 1.3	Systematische Einteilung der Enzymfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen /Reduktasen.	5
Abb. 1.4	Tertiärstruktur der Kette A von Tropinonreduktase II aus <i>D. stramonium</i> .	6
Abb. 1.5	Schematische Darstellung des geordneten bi-bi-Mechanismus klassischer SDR.	6
Abb. 1.6	Mechanismus der Reduktion von 5 α -Androstan-3-on-17-ol mit NADH.	7
Abb. 1.7	Sequenzalignment von Tropinonreduktase II aus <i>D. stramonium</i> mit der 3 β /17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase aus <i>C. testosteronei</i> .	8
Abb. 1.8	Ausschnitt aus der Biosynthese der Tropanalkaloide.	10
Abb. 1.9	Schematische Darstellung der Reduktion von 3-Methylcyclohexanon und der Rückreaktion ausgehend vom 3-Methylcyclohexanol.	12
Abb. 2.1	Kalibriergerade der analytischen Gelfiltration.	29
Abb. 2.2	Beispiel für die Kalibrierung mit NADH.	30
Abb. 2.3	Festlegung der Nummerierung des Kohlenstoffgerüsts des Wieland-Mischer-Ketons und des Hajos-Parrish-Ketons.	36
Abb. 3.1	Sequenz- und Strukturalignment der Cosubstratbinderegionen von At2g29350 und At2g29330.	51
Abb. 3.2	Abhängigkeit der Enzymaktivität von At2g29350(S26A,A48D) von der Substrat- und Cosubstratkonzentration.	53
Abb. 3.3	Simulation der (N)-terminalen Struktur von At2g29350(S26A,A48D).	55
Abb. 3.4	Sequenzalignment der N-terminalen Bereiche von At2g29350 und CoTR sowie Strukturmodell der Cosubstratbinderegion von At2g29350.	56
Abb. 3.5	SDS-Gele der mittels Metallionenaffinitätschromatographie aufgereinigten Proteinchargen.	58
Abb. 3.6	Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert.	60
Abb. 3.7	Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur.	61
Abb. 3.8	Stabilitätstest für NADH und NADPH bei 20 °C und 30 °C sowie pH 5,5, pH 7,0 und pH 7,5.	62
Abb. 3.9	Spezifische Enzymaktivität von At2g29350(S26A,A48D) in Abhängigkeit von Substrat- und Cosubstratkonzentration.	63
Abb. 3.10	Spezifische Enzymaktivität von At2g29350(K27S) und At2g29350(V103A) in Abhängigkeit von Substrat- und Cosubstratkonzentration.	64
Abb. 3.11	Analyse der Gelfiltrationsläufe von At2g29350(S26A,A48D) mit SDS-PAGE.	68
Abb. 3.12	Analyse der Gelfiltrationsläufe von At2g29350 mit SDS-PAGE.	69
Abb. 3.13	Sequenzalignment von CoTR mit At2g29350 und den Chimären CG1 und CG2 sowie graphische Darstellung der Chimären unter Verwendung des Homologie-modells von At2g29350.	71
Abb. 3.14	Messungen der spezifischen Aktivität von CG1, CG1(S27A,A49D,T109F) und CG2 in Abhängigkeit von Cosubstrat- und Substratkonzentration.	74

Abb. 3.15	Pharmacophore Struktur 1341 und Struktur des Wieland-Miescher-Ketons sowie die Enantiomere des Wieland-Miescher- und Hajos-Parrish-Ketons.	75
Abb. 3.16	Mögliche Produktbildung durch die biokatalytische Reduktion des Wieland-Miescher- bzw. Hajos-Parrish-Ketons.	77
Abb. 3.17	Gegenüberstellung der Enantiomerenpaare der möglichen Reduktionsprodukte (Hydroxyketone und Diole) ausgehend von den enantiomerenreinen Wieland-Miescher- und Hajos-Parrish-Ketonen.	78
Abb. 3.18	Herstellung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-1 und (4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-1 ausgehend vom (<i>S</i>)- und (<i>R</i>)-Hajos-Parrish-Keton.	80
Abb. 3.19	Reaktionsfolge zur Herstellung der α,β -gesättigten Hydroxyketone ausgehend vom Hajos-Parrish- und Wieland-Mischer-Keton.	80
Abb. 3.20	Acetal-Schützung der (<i>S</i>)-Enantiomere des Wieland-Miescher- und Hajos-Parrish-Ketons.	80
Abb. 3.21	Reduktion der geschützten (<i>S</i>)-Enantiomere des Wieland-Miescher- und Hajos-Parrish-Ketons mit LiAlH ₄ .	81
Abb. 3.22	Entschützung des reduzierten Wieland-Miescher- und Hajos-Parrish-Ketons.	82
Abb. 3.23	Darstellung der Diole ausgehend von den (<i>S</i>)-Enantiomeren des Wieland-Miescher- und Hajos-Parrish-Ketons.	83
Abb. 3.24	Biokatalytische Umsetzung des (<i>S</i>)-Wieland-Mischer-, (<i>S</i>)-Hajos-Parrish- und (<i>R</i>)-Hajos-Parrish-Ketons durch At2g29350.	84
Abb. 3.25	Biokatalytische Umsetzung des (<i>R</i>)-Wieland-Miescher-, (<i>S</i>)-Wieland-Miescher- und (<i>R</i>)-Hajos-Parrish-Ketons durch CoTR.	85
Abb. 3.26	Semiquantitative Auswertung der enzymatischen Bildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone durch At2g29350, CoTR und ausgewählten Enzymvarianten ausgehend von den (<i>S</i>)- und (<i>R</i>)-Enantiomeren des Wieland-Miescher-Ketons.	87
Abb. 3.27	Semiquantitative Auswertung der enzymatischen Bildung der Nebenprodukte durch CoTR, CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) ausgehend von den (<i>S</i>)- und (<i>R</i>)-Enantiomeren des Wieland-Miescher-Ketons.	88
Abb. 3.28	Semiquantitative Auswertung der enzymatischen Bildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone durch At2g29350, CoTR und ausgewählten Enzymvarianten ausgehend von den (<i>S</i>)- und (<i>R</i>)-Enantiomeren des Hajos-Parrish-Ketons.	91
Abb. 3.29	Semiquantitative Auswertung der enzymatischen Bildung der Nebenprodukte P1 (4 <i>S</i>)-3 und P2 (4 <i>S</i>)-3 durch CoTR, CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) ausgehend von dem (<i>S</i>)-Enantiomer des Hajos-Parrish-Ketons.	92
Abb. 3.30	Spezifische Enzymaktivitäten von At2g29350(S26A,A48D) und At2g29350-(V103A) in Abhängigkeit von den Diketonkonzentrationen.	95
Abb. 3.31	Eingesetzte Substrate für die Cokristallisationsversuche.	97
Abb. 3.32	Kristalle von CoTR aus Bedingung A und B.	98
Abb. 3.33	Asymmetrische Einheiten der Kristallstrukturen A und B von CoTR.	99
Abb. 3.34	Nichtkristallographische Symmetrie innerhalb einer asymmetrischen Einheit zwischen den Ketten A und B sowie C und D in den Kristallstrukturen A und B.	100
Abb. 3.35	Tetramer A/A/B/B von CoTR aus den Dimeren A/A(sym) und B/B(sym) und Tetramer C/D/C/D von CoTR aus den Dimeren C/D und C(sym)/D(sym).	101
Abb. 3.36	Sekundär- und Tertiärstruktur von CoTR.	103
Abb. 3.37	Ausbildung des Dimers zwischen den Ketten A zweier benachbarter asymmetrischer Einheiten und des Tetramers zwischen den Ketten A und B.	105

Abb. 3.38	Cosubstratbindung von CoTR.	106
Abb. 3.39	Katalytische Tetrade von CoTR.	107
Abb. 3.40	Substratbindetasche von CoTR.	108
Abb. 3.41	Liganden im Substratbindebereich der Kristallstrukturen A und B.	110
Abb. 3.42	Strukturalignment der Aminosäuren der Substratbindetasche von CoTR.	111
Abb. 3.43	Strukturalignment der Aminosäuren der Substratbindetasche von CoTR und Vergleich der Oberfläche der Substratbindetasche.	112
Abb. 3.44	Posen des Dockings mit MOE in der Substratbindetasche von CoTR.	114
Abb. 3.45	Zwei Posen von (<i>R</i>)-WMK und zwei Posen von (<i>R</i>)-HPK in der Substratbindetasche von CoTR aus dem Docking mit GOLD.	116
Abb. 3.46	Darstellung der Serinmutante A206S.	118
Abb. 3.47	Semiquantitative Auswertung der Bildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone durch CoTR, CoTR(S27A,A49D) und die A206S-Varianten ausgehend von den (<i>S</i>)- und (<i>R</i>)-Enantiomeren des Wieland-Miescher-Ketons.	119
Abb. 3.48	Semiquantitative Auswertung der Bildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone durch CoTR, CoTR(S27A,A49D) und die A206S-Varianten ausgehend von den (<i>S</i>)- und (<i>R</i>)-Enantiomeren des Hajos-Parrish-Ketons.	120
Abb. 4.1	Multiples Alignment der N-terminalen Sequenzen (Cosubstratbindebereich) der TRL aus <i>A. thaliana</i> At2g29350, At2g29360, At2g29330 und CoTR mit den klassischen SDR aus Tabelle 4.1.	122
Abb. 4.2	Ausschnitt der N-terminalen Cosubstratbinderegion von CoTR.	125
Abb. 4.3	Multiples Alignment der N-terminalen Sequenz von At2g29330 aus <i>A. thaliana</i> mit den N-terminalen Sequenzen von NADH-abhängigen klassischen SDR aus Pflanzen, Tieren und Bakterien.	127
Abb. 4.4	Hypothesen zum Dimer-Tetramer-Gleichgewicht von At2g29350 unter Berücksichtigung der Kristallstruktur und Sequenz von CoTR.	131
Abb. 4.5	(Haupt-)produkte der biokatalytischen Reduktion der (<i>S</i>)- bzw. (<i>R</i>)-Enantiomere des Wieland-Miescher- bzw. Hajos-Parrish-Ketons durch At2g29350 und CoTR sowie ihrer NADH-präferierenden Enzymvarianten.	132
Abb. 4.6	Zielverbindungen ausgehend von den Enantiomeren des Wieland-Miescher-Ketons und des Hajos-Parrish-Ketons.	133
Abb. 4.7	In α -Position zur α,β -ungesättigten Carbonylgruppe methylierte Derivate des Wieland-Miescher- und des Hajos-Parrish-Ketons.	136
Abb. 4.8	Vergleich der Kristallstruktur von CoTR mit dem Homologiemodell.	138
Abb. 4.9	Potenzielle Tetramere in den Strukturen von DsTRI und DsTRII im Vergleich zu den Tetrameren in den Kristallstrukturen von CoTR (Kette C und D).	140
Abb. 4.10	Vergleich der Tertiärstruktur, der katalytischen Tetrade und des relevanten Cosubstratbindebereichs in den Kristallstrukturen von CoTR, DsTRI und DsTRII.	142
Abb. 4.11	Strukturalignment von CoTR und DsTRII mit Cosubstrat und Substrat sowie die molekulare Oberfläche der Substratbindetaschen.	143
Abb. 4.12	Sequenzalignment von CoTR, DsTRI und DsTRII.	143
Abb. 4.13	Substratbindetaschen von CoTR, DsTRII und DsTRI.	144
Abb. 4.14	Weitere potenzielle Mutationsstellen für die Einführung eines Protonendonators in CoTR zur Unterbindung der Bildung der (<i>4R,5S</i>)- α,β -ungesättigten Hydroxyketone.	147

Abb. 6.1	SDS-Gele von CoTR und den Chimären.	162
Abb. 6.2	pH-Abhängigkeit der Aktivität der Enzymvarianten von At2g29350 und CoTR.	164
Abb. 6.3	pH-Abhängigkeit der Aktivität von CG1 und CG2 und ihren Enzymvarianten.	165
Abb. 6.4	Stabilitätstest der Proteine für die analytische Ultrazentrifugation und Gelfiltration.	165
Abb. 6.5	Semiquantitative Auswertung der enzymatischen Bildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone durch CG1 und CG2 sowie ihre Enzymvarianten ausgehend von den (<i>S</i>)- und (<i>R</i>)-Enantiomeren des Wieland-Miescher-Ketons.	166
Abb. 6.6	Semiquantitative Auswertung der enzymatischen Bildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone durch CG1 und CG2 sowie ihre Enzymvarianten ausgehend von den (<i>S</i>)- und (<i>R</i>)-Enantiomeren des Hajos-Parrish-Ketons.	167
Abb. 6.7	Semiquantitative Auswertung der enzymatischen Bildung der Diketone durch At2g29350, CoTR und ausgesuchte Enzymvarianten ausgehend von den (<i>4S,5S</i>)- und (<i>4R,5R</i>)-Diastereomeren der α,β -ungesättigten Hydroxyketone.	168
Abb. 6.8	Ermittlung der kinetischen Parameter für die katalysierten Umsetzungen durch At2g29350 und CoTR.	170
Abb. 6.9	Ermittlung der kinetischen Parameter für die katalysierten Umsetzungen durch CoTR(A49D).	171
Abb. 6.10	Ermittlung der kinetischen Parameter für die katalysierten Umsetzungen durch CoTR(S27A,A49D).	172
Abb. 6.11	Multiplies Sequenzalignment der Tropinonreduktasen I und II aus <i>D. stramonium</i> (DsTRI und DsTRII) mit der Tropinonreduktase aus <i>C. officinalis</i> (CoTR) und den Tropinonreduktase-ähnlichen SDR aus <i>A. thaliana</i> (At2g29350, At2g29360 und At2g29330).	173
Abb. 6.12	Homologiemodelle von J. FISCHER (2015).	174
Abb. 6.13	Sequenz- und Strukturalignment der Cosubstratbinderegionen von CoTR und At2g29330.	175
Abb. 6.14	Vergleich der Tetramere A/A/B/B und C/D/C/D der Kristallstrukturen A und B.	177
Abb. 6.15	Kristallkontakte KK 1. bis KK 3. in Kristallstruktur A.	179
Abb. 6.16	Kristallkontakte KK 1. bis KK 6. in Kristallstruktur B.	180
Abb. 6.17	Strukturalignment der Ketten A-D der Kristallstrukturen A und B.	181
Abb. 6.18	Strukturalignment der Ketten A-D der Kristallstruktur A auf Kette A der Kristallstruktur B.	182
Abb. 6.19	Kristallkontakte (KK) in den Strukturen A und B.	184

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Kommerziell erhältliche KRED-Screening Kits.	3
Tab. 1.2	Gliederung der klassischen SDR in Unterfamilien anhand ihrer Cosubstratspezifität und der Position der relevanten Aminosäuren.	9
Tab. 2.1	Verwendete Bakterienstämme.	14
Tab. 2.2	Leerplasmide und verwendete <i>E. coli</i> Stämme.	14
Tab. 2.3	Rekombinante Plasmide aus der Arbeit von N. REINHARDT (2014).	14
Tab. 2.4	Oligonukleotid-Primer für die Mutagenese-PCR zur Darstellung der Enzymvarianten.	15
Tab. 2.5	Oligonukleotid-Primer für die Mutagenese-PCR und die PCR unter Verwendung der MyFi TM -Taq-DNA Polymerase zur Darstellung der chimären SDR-Enzyme.	15
Tab. 2.6	Verwendete Kultivierungsmedien für <i>E. coli</i> .	16
Tab. 2.7	Bedingungen und Parameter der Metallionenaffinitätschromatographie.	23
Tab. 2.8	Zusammensetzung der SDS-Gele.	26
Tab. 2.9	Coomassie-Färbung: Lösungen und Ablauf.	26
Tab. 2.10	Bedingungen und Parameter der analytischen Ultrazentrifugation.	27
Tab. 2.11	Verwendete Parameter und Bedingungen für die analytische Gelfiltration.	28
Tab. 2.12	Protein- sowie Cosubstrat- und Substratkonzentrationen für die Ansätze der analytischen Gelfiltration.	28
Tab. 2.13	Ablauf der Messmethode mit dem Mikroplattenleser Infinite [®] F200PRO.	31
Tab. 2.14	Verwendete Assaypuffer und pH-Werte.	32
Tab. 2.15	Substrat- und Cosubstratkonzentrationen der Standardassays für Reduktion und Oxidation.	33
Tab. 2.16	Biokatalytische Umsetzungen des Wieland-Miescher- und des Hajos-Parrish-Ketons mit At2g29350 und CoTR.	43
Tab. 2.17	GC-Temperaturgradienten und MS-Analysemethoden.	44
Tab. 2.18	Präparationsansätze für das 96-Well-Screening von CoTR und At2g29350.	46
Tab. 2.19	Screeningkits für das 96-Well-Screening.	47
Tab. 3.1	Spezifische Aktivitäten der Enzymvarianten von At2g29350.	54
Tab. 3.2	Enzymaktivität von At2g29360(A49D) und At2g29360(S27A,A49D).	57
Tab. 3.3	Enzymaktivität von CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D).	57
Tab. 3.4	Kinetische Parameter von CoTR, CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) für die Reduktion mit 3MCH, NADPH und NADH.	65
Tab. 3.5	Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation.	67
Tab. 3.6	Aktivitätstest der Chimären CG1 und CG2 sowie ihrer Enzymvarianten.	72
Tab. 3.7	pH-Optima und natives Molekulargewicht der Chimären und ihrer Enzymvarianten	73
Tab. 3.8	Aktivität der Tropinonreduktase-ähnlichen Enzyme, von CoTR und ihrer mit NADH aktiven Enzymvarianten gegenüber den Enantiomeren des Wieland-Miescher- und Hajos-Parrish-Ketons.	76
Tab. 3.9	Bedingungen, Ausbeute und Produktverhältnis der Reduktion des Wieland-Miescher-Ketons mit NaBH ₄ .	79

Tab. 3.10	Qualitative Produktbildung ausgehend vom (<i>S</i>)-Wieland-Miescher- und (<i>R</i>)-Wieland-Miescher-Keton.	86
Tab. 3.11	Qualitative Produktbildung ausgehend vom (<i>S</i>)-Hajos-Parrish- und (<i>R</i>)-Hajos-Parrish-Keton.	90
Tab. 3.12	Kinetische Parameter für die Umsetzung der Enantiomere des Wieland-Miescher- und des Hajos-Parrish-Ketons.	94
Tab. 3.13	Kristallisationsbedingungen von CoTR.	97
Tab. 3.14	Angaben zu den Kristallstrukturen.	98
Tab. 3.15	Interaktionsflächen zur Ausbildung der Quartärstruktur in den Kristallstrukturen A und B.	102
Tab. 3.16	Abstand für die Hydridübertragung und die Länge der Wasserstoffbrückenbindungen der Carbonylgruppe zu den Hydroxygruppen von Y168 und S155.	113
Tab. 4.1	Arbeiten zur Änderung der Cosubstratpräferenz von NADP(H) zu NAD(H) an kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen.	121
Tab. 4.2	Kinetische Parameter der Wildtyp-Enzyme (WT) und Enzymvarianten mit veränderter Cosubstratpräferenz.	123
Tab. 4.3	Beispiele für die chemisch synthetische Herstellung von Natur- und Wirkstoffen sowie ihrer Derivate oder Kernstrukturen ausgehend von den beiden Enantiomeren des Wieland-Miescher- und des Hajos-Parrish-Ketons über die Zwischenstufen (<i>4S,5S</i>)- und (<i>4R,5R</i>)-2 sowie (<i>4S,5S</i>)- und (<i>4R,5R</i>)-1.	134
Tab. 4.4	Biokatalytische Ansätze zur Reduktion des Wieland-Miescher- und des Hajos-Parrish-Ketons.	136
Tab. 4.5	Übersicht der Kristallstrukturen der Tropinonreduktasen I und II aus <i>D. stramonium</i> .	138
Tab. 4.6	Interaktionsflächen zur Ausbildung der Quartärstruktur in den Kristallstrukturen der Tropinonreduktasen I und II im Vergleich zu der durchschnittlichen Größe in den Kristallstrukturen A und B von CoTR.	139
Tab. 4.7	Natives Molekulargewicht verschiedener Tropinonreduktasen I und II.	141
Tab. 4.8	Prozentuale Bildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone durch CoTR-Enzymvarianten.	146
Tab. 4.9	Kinetische Parameter von At2g29350- und CoTR-Enzymvarianten im Vergleich mit anwendungsrelevanten Ketoreduktasen.	149
Tab. 6.1	Liste der verwendeten Feinchemikalien.	153
Tab. 6.2	Liste der Standardgeräte.	153
Tab. 6.3	Lyse der Bakterienpellets für die Metallionenaffinitätschromatographie.	154
Tab. 6.4	Bedingungen für die Metallionenaffinitätschromatographie der verschiedenen Proteine.	154
Tab. 6.5	Verwendete Assaypuffer, pH-Werte und Herstellung.	154
Tab. 6.6	Bedingungen der Aktivitätsmessungen für die Reduktion.	155
Tab. 6.7	Bedingungen für die Messung der pH-Abhängigkeit der spezifischen Aktivität (Reduktion).	155
Tab. 6.8	Bedingungen für die Messung der pH-Abhängigkeit der spezifischen Aktivität (Oxidation).	156
Tab. 6.9	Bedingungen für die Messung der spezifischen Aktivität abhängig von der Temperatur.	156

Tab. 6.10	Bedingungen für die Messung der Aktivität mit den Diketonen.	156
Tab. 6.11	Bedingungen der Enzymkinetiken.	157
Tab. 6.12	Bedingungen für die GCMS-Ansätze mit 3MCH und 3MCHol.	158
Tab. 6.13	Bedingungen für die GCMS-Ansätze mit den Diketonen und Hydroxyketonen.	159
Tab. 6.14	Kristallisationsbedingungen des fine screenings von CoTR.	159
Tab. 6.15	Substrat- und Cosubstratkonzentrationen für das erweiterte fine screening.	160
Tab. 6.16	Gegenüberstellung der Expressions- und Aufreinigungsbedingungen der Wildtyp-Enzyme At2g29350 und CoTR.	162
Tab. 6.17	Proteinausbeute der Wildtyp-Enzyme im Vergleich zu ihren Enzymvarianten und Chimären.	163
Tab. 6.18	Qualitative Produktbildung ausgehend vom (<i>S</i>)-Wieland-Miescher-, (<i>R</i>)-Wieland-Miescher-, (<i>S</i>)-Hajos-Parrish- und (<i>R</i>)-Hajos-Parrish Keton.	169
Tab. 6.19	Statistik der Datensammlung und der Strukturverfeinerung für die Kristallstrukturen A und B von CoTR.	176
Tab. 6.20	Weitere Interaktionsflächen innerhalb und zwischen den asymmetrischen Einheiten, welche nicht an der Ausbildung der Quartärstruktur beteiligt sind (Kristallkontakte, KK).	178
Tab. 6.21	RMSD-Werte zwischen den Ketten A-D innerhalb und zwischen den beiden Kristallstrukturen A und B.	183
Tab. 6.22	NADH-abhängige klassische SDR aus den Reichen der Pflanzen, Tiere und Bakterien.	184

1 Einleitung

1.1 Enzyme als Biokatalysatoren in der Wirkstoffherstellung

Die chemische Synthese organischer Moleküle stellt seit jeher eine große Herausforderung dar. Besonders in der Wirkstoffherstellung ist es aufgrund der meist sehr komplexen Strukturen und dem hohen Anspruch an die Reinheit wichtig, gut funktionierende Syntheserouten zu entwickeln. Um dieses Ziel zu erreichen, werden seit einigen Jahren verstärkt Enzyme als Biokatalysatoren genutzt. Vor allem Kettoreduktasen, Transaminasen, Hydrolasen und Aldolasen finden Anwendung in der Synthese von pharmazeutisch wirksamen Verbindungen. Ihr Vorteil gegenüber den traditionellen Metallo- und Organokatalysatoren besteht in dem ausgeprägten Kontakt zwischen Enzym und Substrat innerhalb der Substratbindetasche. Dadurch ergeben sich eine hohe Substratspezifität und eine Produktbildung mit starker Stereo-, Chemo- und Regiokontrolle. Der Einsatz von Biokatalysatoren anstelle chemischer Reagenzien ist zudem wirtschaftlich und ökologisch vorteilhaft. So können Syntheserouten verkürzt werden, weil z. B. auf Schutzgruppen verzichtet werden kann. Außerdem ist die Reaktionsaufarbeitung meist einfacher und die Prozesse sind sicherer, da die Reaktionen bei Temperaturen um die 30 °C, Atmosphärendruck und moderatem pH-Wert durchgeführt werden. Aus ökologischer Sicht fällt der Einsatz von Biokatalysatoren in den Bereich der sogenannten „Green Chemistry“, da sie aus erneuerbaren Rohstoffen hergestellt werden und biologisch abbaubar sind. Zudem sind sie nicht giftig und der Einsatz von organischen Lösungsmitteln kann reduziert werden. Die in der chemischen Synthese häufig eingesetzten Schwermetalle entfallen und somit auch die aufwendige Entsorgung von Schwermetallrückständen (Bornscheuer et al., 2012; Clouthier et al., 2011).

1.2 Kettoreduktasen in der chemischen Synthese

Durch die häufige Prochiralität von Carbonylgruppen stellt die Reduktion dieser funktionellen Gruppe bei der Kontrolle der Stereochemie in der Wirkstoffherstellung eine besondere Herausforderung dar. Die Kontrolle der Stereochemie ist aus biologischer Sicht unabdingbar, da sowohl Diastereomere als auch Enantiomere eine völlig unterschiedliche Wirkung auf den Organismus haben können. Bei pharmazeutisch wirksamen Substanzen kann dieses unter Umständen verheerende Folgen haben, wie das Beispiel des Thalidomids (Contergan) gezeigt hat. Das (*R*)-Enantiomer des Thalidomids wirkt sedativ, wohingegen das (*S*)-Enantiomer die bekannte embryotoxische Wirkung aufweist (Blaschke et al., 1979). In der chemischen Synthese wird die Stereochemie während der Reduktion der Carbonylgruppe entweder durch sub-

1 Einleitung

strat- oder reagenzkontrollierte Reaktionen gesteuert. Ein Beispiel für eine substratkontrollierte Reduktion ist die Herstellung von *syn*-1,3-Diolen ausgehend von einem β -Hydroxyketon mittels $\text{NaBH}_4/\text{Et}_2\text{BOMe}$ über einen sesselförmigen Übergangszustand (Chen et al., 1987). Ein wichtiges Beispiel für eine reagenzkontrollierte Reaktion ist die CBS-Reduktion (Corey, Bakshi, Shibata). Dabei wird das achirale Reduktionsmittel (BH_3) zusammen mit einem chiralen Hilfsreagenz, einem Prolin-Derivat, eingesetzt (Corey et al., 1987a-b, 1988). Die stereoselektive Reduktion von Carbonylverbindungen wird umso schwieriger, je komplexer eine Verbindung aufgebaut ist. Befinden sich zudem mehrere funktionelle Gruppen im Molekül müssen zusätzlich Chemo- und Regioselektivitäten, z.B. durch den Einsatz von Schutzgruppen, kontrolliert werden. Für die stereospezifische Reduktion von einfachen bis komplexen Molekülen bietet sich daher die Verwendung von Enzymen an. Im Folgenden sind Auszüge der Wirkstoffsynthesen von Atorvastatin, Atazanavir und Montelukast (Abb. 1.1a-c) als Beispiele für den industriellen Einsatz von Ketoreduktasen (KRED) dargestellt (Bornscheuer et al., 2012; Clouthier et al., 2011).

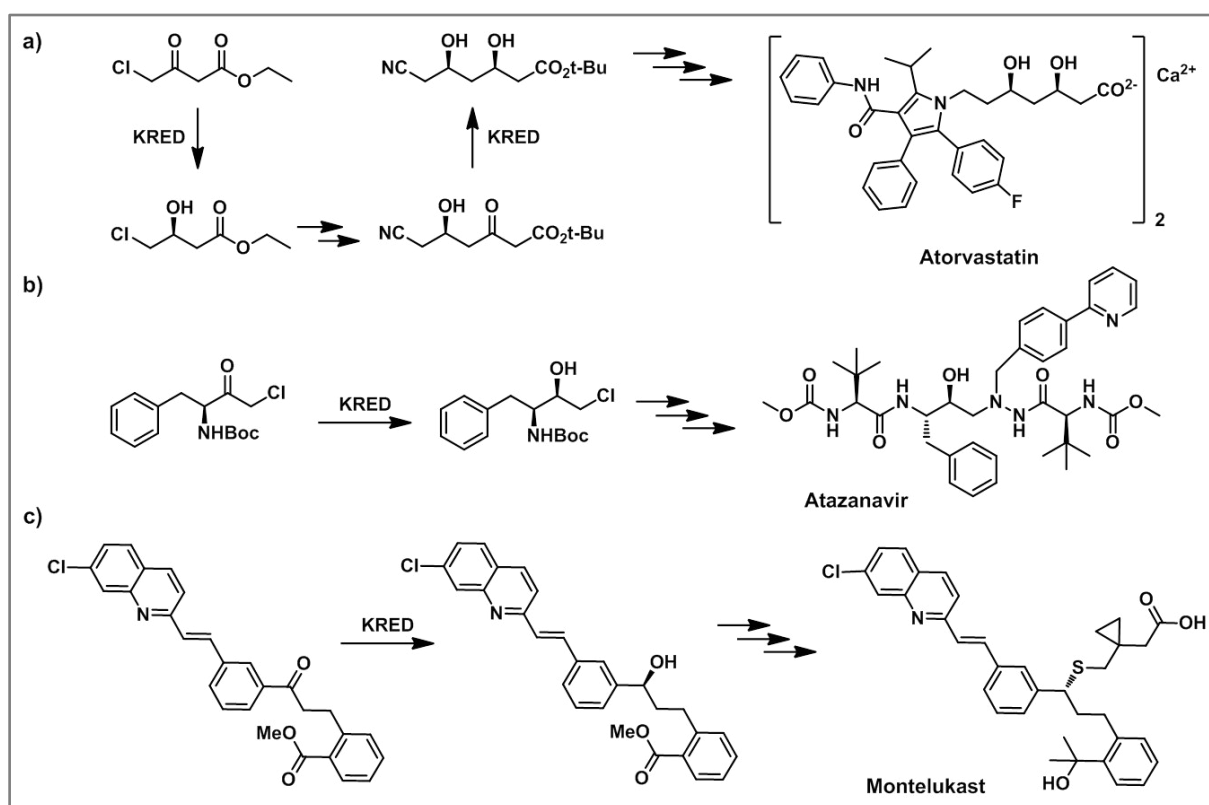


Abb. 1.1: Beispiele für die industrielle Anwendung von Ketoreduktasen (KRED) in Wirkstoffsynthesen (Bornscheuer et al., 2012; Clouthier et al., 2011). a) Atorvastatin; b) Atazanavir; c) Montelukast.

Bei der Synthese des Cholesterinsenkers Atorvastatin kommen gleich zwei Ketoreduktasen zum Aufbau der *syn*-Diol-Struktur der Seitenkette zum Einsatz (Morikawa et al, 2005; Ma et

1 Einleitung

al., 2010b; US 7879585 B2). In der Syntheseroute des antiretroviralen Atazanavirs wird das zentrale Stereozentrum durch eine Ketoreduktase zu einem frühen Zeitpunkt der Synthese eingefügt (Patel et al., 2003; WO 2011005527 A2). Die Verwendung einer Ketoreduktase in der Synthese des Antiasthmatikums Montelukast zeigt hingegen die Reduktion eines komplexen Intermediats (Liang et al., 2010; WO 2009042984 A1).

Um den Einsatz von Enzymen in der Synthese zu vereinfachen, bieten verschiedene biotechnologische Unternehmen inzwischen kommerziell erhältliche Screening Kits mit der Option auf problemorientierte Optimierung an (Tab. 1.1).

Tab. 1.1: Kommerziell erhältliche KRED-Screening Kits (Stand: Dezember 2016).

Unternehmen	Kit und Anzahl enthaltener Reduktasen	Preis
Codexis	Codex® Ketoreductase (KRED) Screening Kits 24	\$3000
SyncoZyms	Kit(KRED-1), Kit(KRED-2) 94, 56	\$1299, \$1199
PROZOMIX	Aldo-Keto Reductase Panel 203	£1990

Ein wichtiger Aspekt bei der Verwendung von Ketoreduktasen im industriellen Maßstab ist das benötigte Cosubstrat. Viele Ketoreduktasen nutzen für die Reduktion von Carbonylverbindungen äquimolare Mengen der Nicotinamadenindinukleotide NADPH und NADH als Reduktionsmittel. Dabei ist aus ökonomischer Sicht nicht unerheblich welches Cosubstrat benötigt wird, da der Einsatz von NADPH (524,95 €/g, Applichem, Dezember 2016) mit höheren Kosten verbunden ist als der von NADH (45,51 €/g, Applichem, Dezember 2016). Um die Kosten zu senken, wurden Cosubstrat-Recycling-Systeme entwickelt. In Abbildung 1.2 sind verschiedene Systeme aufgezeigt. Ein Beispiel ist die Glukose Dehydrogenase (GDH) in Verbindung mit Glukose (Morikawa et al, 2005). Durch den Einsatz der GDH läuft parallel zur Reduktion der Carbonylverbindung die Oxidation von Glukose zum Glukonat ab, wodurch NAD(P)^+ reduziert und somit NAD(P)H regeneriert wird. Eine andere Variante ist der Einsatz einer weiteren Alkoholdehydrogenase (ADH), die Isopropanol zu Aceton oxidiert (Bradshaw et al., 1992). Einige KRED wurden inzwischen soweit optimiert, dass keine weiteren ADH eingesetzt werden müssen. Die KRED reduzieren dann nicht nur das Substrat zum gewünschten Produkt, sondern regenerieren zusätzlich NAD(P)^+ unter Oxidation von Isopropanol. 19 der 24 Ketoreduktasen im KRED Screening Kit von Codexis (Tab. 1.1) sind dazu in der Lage, wodurch kein zusätzliches Enzym eingesetzt werden muss (Codexis® KRED Screening Kit, Screening Protokoll, Oktober 2015). Zwei weitere Systeme beinhalten zum einen Formatdehydrogenasen (FDH) mit Ameisensäure (Morikawa et al., 2005; Hoelsch et al.,

1 Einleitung

2013) und zum anderen Phosphitdehydrogenasen (PTDH) mit Phosphit (Johannes et al., 2007).

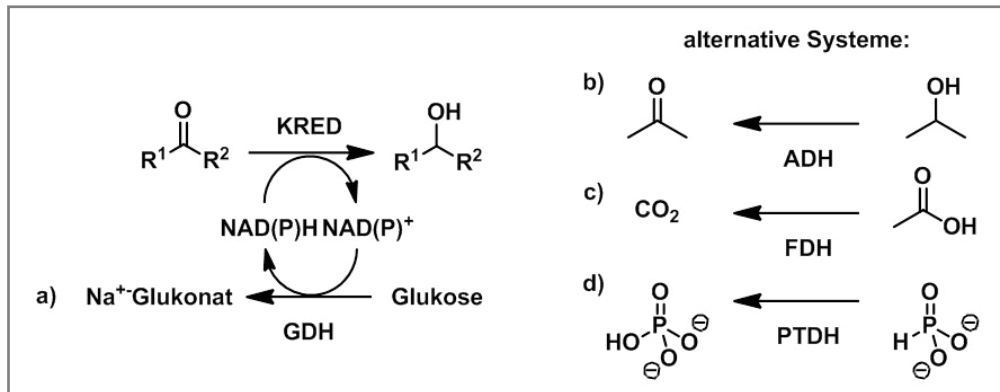


Abb. 1.2: Beispiele für Cosubstrat-Recycling-Systeme bei der Anwendung von Ketoreduktasen (KRED). a) Einsatz einer Glukose Dehydrogenase (GDH) mit Glukose; b) Einsatz einer Alkoholdehydrogenase (ADH) mit Isopropanol; c) Einsatz einer Formatdehydrogenase (FDH) mit Ameisensäure; d) Einsatz einer Phosphitdehydrogenase (PTDH) mit Phosphit.

Voraussetzung für den Einsatz von Cosubstrat-Recycling-Systemen ist, dass die Ketoreduktasen nicht negativ durch die zusätzlichen Substrate, die resultierenden Produkte oder die zusätzlich eingesetzten Enzyme beeinflusst werden. Nachteile des Cosubstrat-Recyclings sind der zusätzliche Materialaufwand, die damit verbundenen Kosten und die aufwendigere Aufarbeitung. Ob mit oder ohne Cosubstrat-Recycling-System bleibt es auf Grund der höheren Kosten für NADPH weithin von großem Interesse, mit NADH aktive Ketoreduktasen für den Einsatz als Biokatalysatoren zu finden oder diese durch gezielte Optimierung zu erhalten.

1.3 Kurzkettige Dehydrogenasen/Reduktasen

Vertreter der Superfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (short-chain dehydrogenases/reductases, **SDR**) sind in allen Organismen zu finden. In der UniprotKB-Datenbank (www.uniprot.org) sind aktuell (Stand: Dezember 2016) fast 428.300 Einträge unter der Zuordnung SDR zu finden. Aufgrund der hohen Anzahl an Mitgliedern war es notwendig eine systematische Nomenklatur für die SDR zu entwickeln. Anhand von Sequenzmotiven, Länge und Aktivität wurden die SDR in sieben Familien unterteilt (Abb. 1.3; Kallberg et al., 2002; Persson et al., 2009; Kallberg et al., 2010; Persson et al., 2013). Die klassischen SDR (Classic, (C)) bilden dabei die größte Gruppe, gefolgt von den verlängerten (Extended, (E)), den unbekanntem (Unassigned, (U)), den komplexen (Complex, (C)), den abweichenden (Divergent, (D)), den intermediären (Intermediär, (I)) sowie den atypischen (Atypical, (A)) SDR. Die sieben Gruppen sind noch weiter in Unterfamilien aufgegliedert und die Zuordnung

1 Einleitung

wird durch die laufende Einbeziehung neuer Sequenzen und experimenteller Daten stetig weiterentwickelt (www.sdr-enzymes.org).

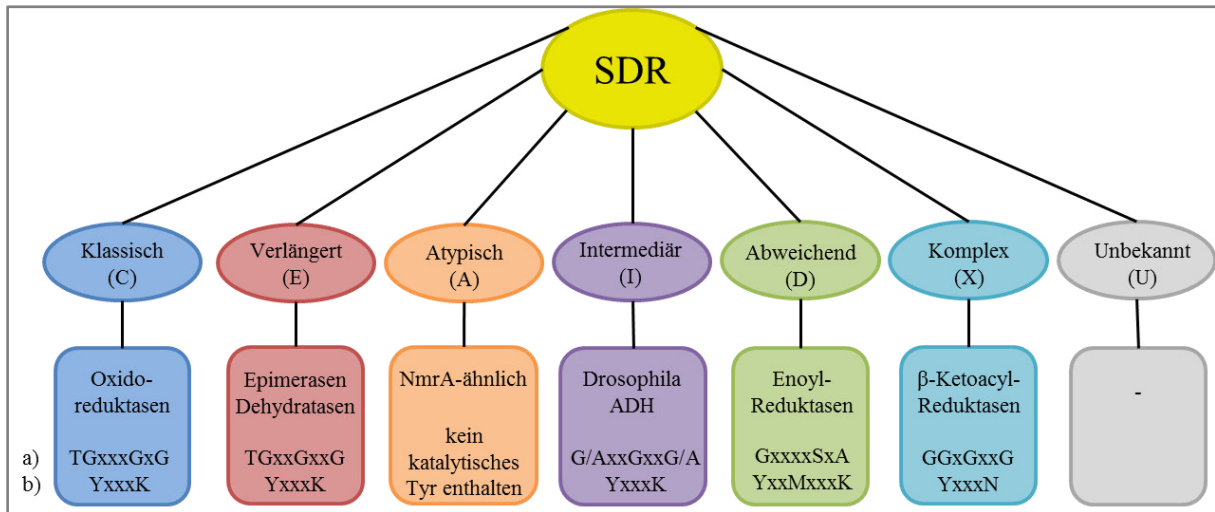


Abb. 1.3: Systematische Einteilung der Enzymfamilie der kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen (SDR). Für die Gruppen der bekannten SDR (C-X) sind jeweils ein charakteristischer Vertreter sowie die wichtigsten konservierten Sequenzmotive (Glycin-reiches (a) und katalytisches Motiv (b)) angegeben. Nmr A: Stickstoff Metabolit Repression Protein A; ADH: Alkoholdehydrogenase. Abbildung modifiziert nach Persson et al. (2013).

Die SDR haben eine durchschnittliche Länge von 250 (klassische SDR) bis 350 (verlängerte SDR) Aminosäuren und weisen im direkten Vergleich eine Proteinsequenzidentität von 15-30% auf. Trotz dieser geringen Übereinstimmung zeichnen sich SDR durch eine sehr konservierte dreidimensionale Struktur aus, deren Kern durch die sogenannte Rossmann-Faltung gebildet wird. Die Rossmann-Faltung besteht aus einem zentralen 7-gliedrigen-β-Faltblatt flankiert von jeweils zwei bis drei Helices auf beiden Seiten und ist charakteristisch für verschiedene dinukleotidbindende Enzyme (Rossmann et al., 1974).

Ein Vertreter der klassischen SDR ist Tropinonreduktase II aus *Datura stramonium* (DsTRII). DsTRII katalysiert die Umsetzung von Tropinon zu Tropin unter Verbrauch von NADPH als Cosubstrat. Abbildung 1.4 zeigt die Tertiärstruktur eines Monomers von DsTRII (PDB-Code: 1IPF; im Komplex mit NADPH und Tropinon; Yamashita et al., 2003). Das 7-gliedrige-β-Faltblatt (βA-βG) bildet zusammen mit den sechs Helices (αB-αG) die Rossmann-Faltung. In Kombination mit den beiden, von der Rossmann-Faltung unabhängigen, Helices αG'' und αG', bildet sich ein Spalt in der Proteinstruktur, in dem die Cosubstrat- und die Substratbindetasche liegen. Für die Cosubstratbindung (NADPH) ist vor allem der N-terminale Bereich der Struktur entscheidend, wohingegen der C-terminale Bereich maßgeblich für die Substratbindung (Tropinon) ist. Der Teil des C-terminalen Bereichs, der nicht zur Rossmann-

1 Einleitung

Faltung gehört und die Loop-Strukturen im Substratbindebereich sind zwischen den einzelnen SDR sehr variabel und führen zu einem breiten Substratspektrum innerhalb der SDR-Superfamilie (Kavanagh et al., 2008).

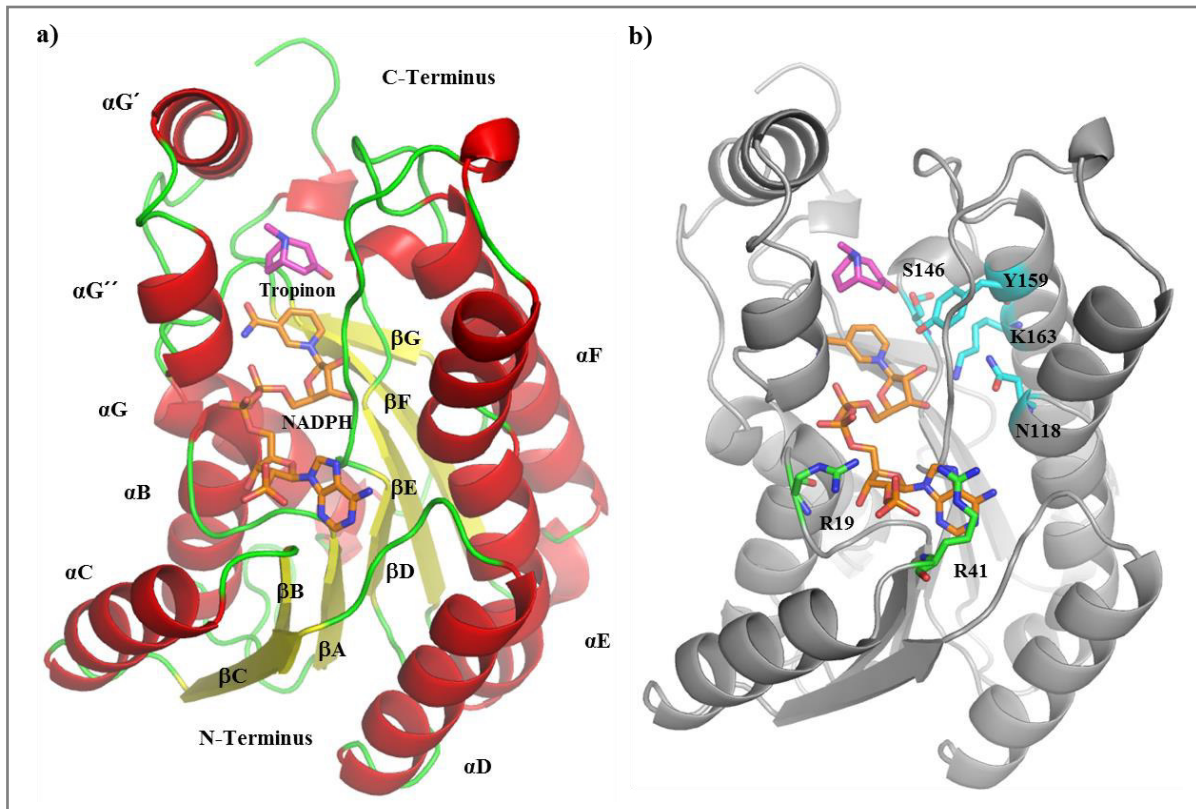


Abb. 1.4: Tertiärstruktur der Kette A von Tropinonreduktase II aus *D. stramonium*. PDB-Eintrag: 1IPF; Liganden: orange: NADPH; pink: Tropinon. a) Sekundärstruktur: gelb: zentrales β -Faltblatt aus β A- β G; rot: Helices α B- α G der Rossmann-Faltung sowie α G' und α G'' der Substratbinde tasche; grün: Loop-Strukturen; b) hellblau: katalytische Tetrade; grün: basische Aminosäuren zur Bindung von NADPH.

Ein häufiger Reaktionsmechanismus für die klassischen SDR ist ein geordneter bi-bi Mechanismus (Beispiele: Nakanishi et al., 1997; Sahni-Arya et al., 2007).

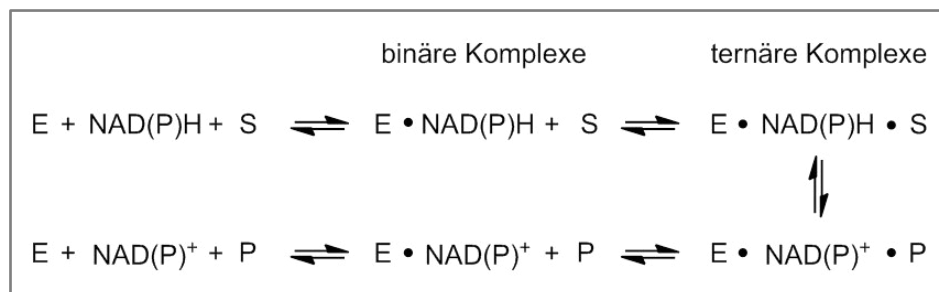


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des geordneten bi-bi-Mechanismus klassischer SDR. Modifiziert nach Sahni-Arya et al. (2007). E = Enzym, S = Substrat, P = Produkt.

Dabei wird zuerst das Cosubstrat vom Enzym gebunden und es entsteht ein binärer Komplex (Abb. 1.5). Als zweites wird das Substrat gebunden, wodurch ein ternärer Komplex gebildet

1 Einleitung

wird. Nach der Reaktion liegt ein ternärer Komplex aus Enzym, umgesetztem Cosubstrat und Produkt vor. Aus diesem Komplex wird zuerst das Produkt freigesetzt, wodurch ein zweiter binärer Komplex entsteht. Zuletzt verlässt das umgesetzte Cosubstrat das Enzym.

Bei den klassischen SDR wird die eigentliche Reaktion (Reduktion bzw. Oxidation) in der Substratbindetasche durch vier Aminosäuren (S, Y, K, N) katalysiert (vergl. Abb. 1.4b). Der Mechanismus dieser katalytischen Tetrade ist am Beispiel der Reduktion von 5α -Androstan-3-on-17-ol durch die NADH-abhängige $3\beta/17\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase ($3\beta/17\beta$ -HSD) aus dem Bakterium *Comamonas testosteroni* aufgezeigt (Abb. 1.6; Filling et al., 2002). Das Substrat wird über eine Wasserstoffbrücke zu S138 gebunden und somit in unmittelbarer Nähe zum Nicotinamidring des Cosubstrats positioniert, wodurch die Übertragung des 4 pro-S-Hydrids auf das Carbonylkohlenstoffatom des Substrats erleichtert wird. Y151 fungiert als katalytische Säure, deren Proton durch den Carbonylsauerstoff nukleophil abgefangen wird. Der pK_a -Wert des Tyrosins wird über mehrere Wasserstoffbrücken (Protonen-Relay-System) herabgesetzt, wodurch der Protonenübergang auf die Carbonylgruppe erleichtert wird. Maßgeblich an dem Protonen-Relay-System beteiligt sind die Nicotinamidribose und K155. Zusätzlich wird ein Wassermolekül über die Peptidcarbonylfunktion von N111 in räumlicher Nähe zu K155 gebunden, wodurch sich das Protonen-Relay-System fortsetzt und formal ein Proton ausgehend vom protonierten Lösungsmittel übertragen wird.

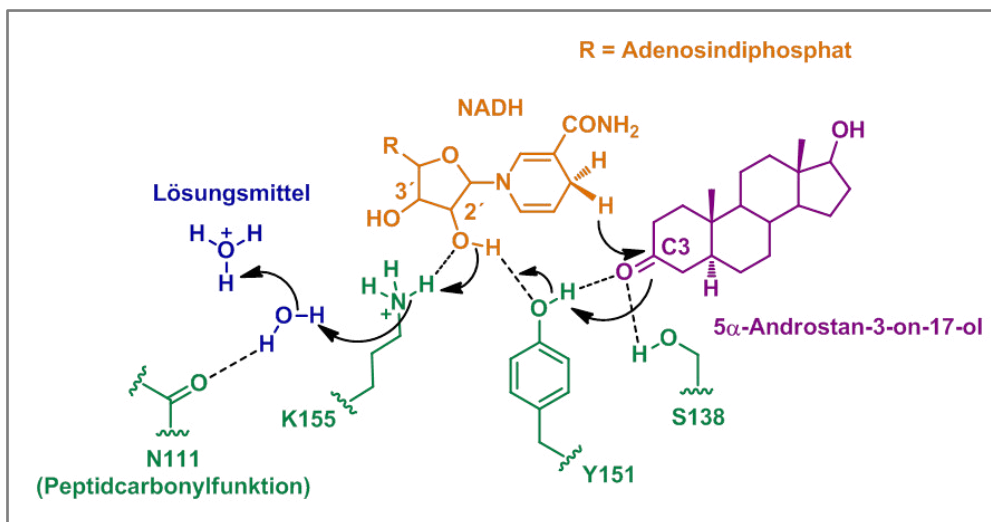


Abb. 1.6: Mechanismus der Reduktion von 5α -Androstan-3-on-17-ol mit NADH. Katalytische Tetrade: S138, Y151, K155, N111. Abbildung modifiziert nach Filling et al. (2002).

Abbildung 1.7 zeigt das Alignment der Aminosäuresequenzen von zwei Enzymen aus der Gruppe der klassischen SDR; TRII aus *D. stramonium* und $3\beta/17\beta$ -HSD aus *C. testosteroni*. Neben der katalytischen Tetrade (N-S-Y-K) liegen noch drei weitere, hoch konservierte Se-

1 Einleitung

quenzmotive und Aminosäuren in den klassischen SDR vor. Zum einen das Motiv NNAG, welches an der Stabilisierung des zentralen β -Faltblattes beteiligt ist und zum anderen ein Asparat im N-terminalen Bereich der Sequenz (DsTRII: D66, $3\beta/17\beta$ -HSD: D60), welches das Cosubstrat über den Adeninring bindet (Oppermann et al., 2002). Das dritte konservierte Motiv ist das Glycin-reiche Motiv TGxxxGxG im N-terminalen Bereich der Sequenz. Sowohl das katalytische als auch das Glycin-reiche Motiv sind elementar für die Einordnung der SDR in die sieben Familien (vergl. Abb. 1.3). Die Sequenzen der beiden Enzyme zeigen zudem im Vergleich die drei Aminosäuren, die maßgeblich die Cosubstratspezifität der klassischen SDR bestimmen (Kallberg et al., 2002). Liegt im Glycin-reichen Motiv eine basische Aminosäure (Position a, DsTRII \rightarrow R) und/oder nach dem zweiten β -Faltblatt (Position c, DsTRII \rightarrow R) vor, akzeptiert das Protein mit hoher Wahrscheinlichkeit NADP(H) als Cosubstrat wie DsTRII (vergl. Abb. 1.4b). Besitzt das Protein hingegen eine saure Aminosäure am Ende des zweiten β -Faltblattes (Position b, $3\beta/17\beta$ -HSD \rightarrow D) ist es mit hoher Wahrscheinlichkeit mit NAD(H) aktiv wie $3\beta/17\beta$ -HSD.

Position:	a	bcd	
DsTRII	MAGRWNLEGCTALVTGGSRGIGYGIVEELASLGASVYTCSRNQKELNDCLTQWRSGFKV	60	
3b/17b-HSD	--MTNRLQGKVALVTGGASGVGLEVVKLLLGEQAKVAFSDINEAAGQQLAAELGERSMFV	58	
	.*: * .*****: *: * *: * . *.* * .. * : : : : . : . : *		
DsTRII	EASVCDLSSRSERQELMNTVANHFHGKLNILVNNAGIVIYKEAKDYTVEDYSLIMSINFE	120	
3b/17b-HSD	---RHQVSSEADW-TLVMAAVQRRLGTLNVLVNNAGILLPGDMETGRLEDFSRLLKINTE	114	
	*: * : : : * : : : : * . * : * : * : * : : : : : : * : * : * : * *		
DsTRII	AAYHLSVLAHFPLKASERGNVVFISVSGALAVPYEAVYGATKGAMDQLTRCLAFEWAKD	180	
3b/17b-HSD	SVFIGCQQGIAAMK-ETGGSINMASVSSWLPYEQYAGYSASKAAVSAALTRAALSCRKQ	173	
	: : . . : * . * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *		
DsTRII	--NIRVNGVGPVIATSLVEMTIQDPEQKENLNKLIIDRCALRRMGPEKELAAAMVAFLCFP	238	
3b/17b-HSD	GYAIRVNSIHDPGIYTPMMAQSLPKGVSKEMVLHDPKLNRRAGRAYMPERIAQLVLFVFLASD	233	
	****. : * * * : : : . . ** : : . * * : : * : * : * : * *		
DsTRII	AASYVTGQIIYVDGGLMANCGF	260	
3b/17b-HSD	ESSVMSGSELHADNSILG-MGL	254	
	: * : : * . : : . * : : . : * :		

Abb. 1.7: Sequenzalignment (EMBL-EBI/Clustal Omega) von Tropinonreduktase II aus *D. stramonium* (DsTRII) mit der $3\beta/17\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase aus *C. testosteroni* ($3\beta/17\beta$ -HSD, 3b/17b-HSD). Grau: Glycin-reiches Motiv der klassischen SDR; dunkelblau: konserviertes D; gelb: Motiv zur Stabilisierung des zentralen β -Faltblattes; grün: basische Aminosäuren für die NADP(H)-Bindung; pink: saure Aminosäure für die NAD(H)-Bindung; hellblau: katalytische Tetrade. a-d: Aminosäurepositionen mit Bedeutung für die Cosubstratspezifität (Tab. 1.2; Kallberg et al., 2002)

Anhand der für die Cosubstratbindung verantwortlichen Aminosäuren wurden die klassischen SDR in sieben Unterfamilien gegliedert (Tab. 1.2; Kallberg et al., 2002). Neben der Position b können sich die sauren Aminosäuren (D oder E) zudem auch in den Positionen c oder d befinden (Abb. 1.7; Tab. 1.2).

1 Einleitung

Tab. 1.2: Gliederung der klassischen SDR in Unterfamilien anhand ihrer Cosubstratspezifität und der Position der relevanten Aminosäuren. Modifiziert nach Kallberg et al. (2002).

Unterfamilie	Cosubstratspezifität	Position/Aminosäure			
		a	b	c	d
cD1d	NAD(H)		D		
cD1e	NAD(H)		E		
cD2	NAD(H)			D/E	
cD3	NAD(H)				D/E
cP1	NADP(H)	K/R			
cP2	NADP(H)			K/R	
cP3	NADP(H)	K/R		K/R	

Die SDR weisen in ihrer Quartärstruktur entweder Homodimere oder Homotetramere auf. So liegt die Alkohol Dehydrogenase aus *Drosophila melanogaster* (DADH; PDB-Code: 1MG5, Benach et al., 2005) als Homodimer vor, wohingegen 3 β /17 β -HSD (PDB-Code: 1HXH; Benach et al., 2002) als Homotetramer vorliegt. Die Homodimere werden aus zwei Monomeren über ein Bündel aus vier Helices gebildet. Zwei Helices (α E und α F) des einen Monomers interagieren mit den entsprechenden Helices des anderen Monomers, gedreht um 180°. Die Dimerisierungsachse wird auch als Q-Achse bezeichnet. Die Homotetramere werden durch die Dimerisierung von zwei Homodimeren entlang der sogenannten P-Achse erhalten (Ghosh et al., 1991). Für die Ausbildung der Homotetramere sind Wechselwirkungen zwischen den C-terminalen Sequenzen (α G, β G und Loop-Bereiche) der Monomere verantwortlich. In Spezialfällen sind für die SDR auch reine Monomere (Ghosh et al., 2001) bekannt. Für die Oxidoreduktase Gox2253 aus *Gluconobacter oxydans*, einer erweiterten SDR, wurde zudem die Kristallstruktur eines Trimers erhalten, jedoch stellt dieses Ergebnis eine Ausnahmen dar und kann wahrscheinlich auf die Packung bzw. Anordnung im Kristall zurückgeführt werden (Yin et al., 2014).

1.4 Tropinonreduktasen und Tropinonreduktase-ähnliche Enzyme

Tropinonreduktasen werden in die Familie der klassischen SDR und in die Unterfamilie SDR65C eingeordnet. Die Enzyme werden vor allem in diversen Solanaceen-Arten (z. B. *D. stramonium* und *Atropa belladonna*) gefunden und katalysieren die stereospezifische Reduktion von Tropinon zu entweder Tropin oder Pseudotropin (Abb. 1.8). Damit sind sie für die wichtigste Verzweigung innerhalb des Biosynthesewegs von Tropanalkaloiden von Bedeutung (Dräger, 2006). Das Enzym, das für die Reduktion von Tropinon zu Tropin verantwortlich ist, wird als Tropinonreduktase I (TRI) bezeichnet. TRI ist zudem in der Lage Tropin zu Tropinon

1 Einleitung

zu oxidieren. Aus dem Zwischenprodukt Tropin werden die bioaktiven und pharmazeutisch genutzten Tropanalkaloide Atropin (racemisches Gemisch aus (*S*)- und (*R*)-Hyoscyamin) und Scopolamin gebildet. Tropinonreduktase II (TRII) hingegen katalysiert die Reduktion von Tropinon zu Pseudotropin, nicht jedoch die Rückreaktion. Folgeprodukte ausgehend von Pseudotropin sind die Calystegine, die auf Grund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu Monosacchariden als Glykosidase Inhibitoren fungieren (Asano et al., 2000).

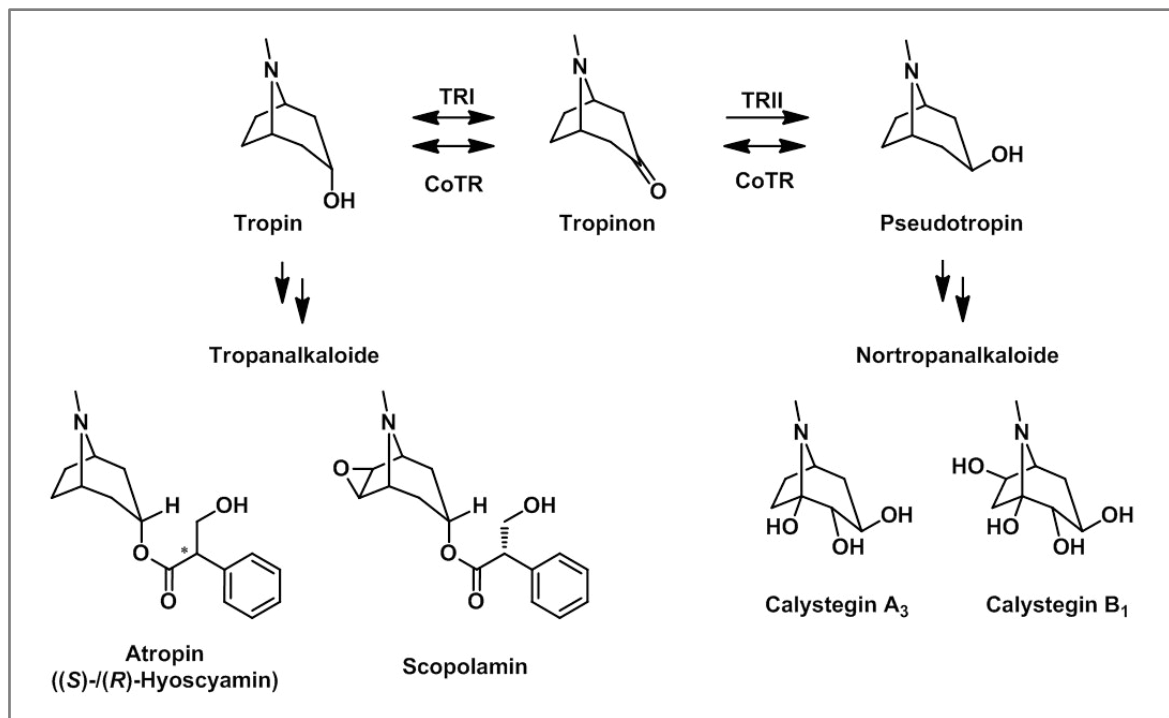


Abb. 1.8: Ausschnitt aus der Biosynthese der Tropanalkaloide. TRI = Tropinonreduktase I, TRII = Tropinonreduktase II, CoTR = Tropinonreduktase aus *Cochlearia officinalis*.

Aus der Brassicaceae *Cochlearia officinalis* wurde eine klassische SDR isoliert, die eine Aminosäuresequenzidentität von 51% zur TRI und zur TRII aus *D. stramonium* aufweist (Brock et al., 2008; Brock, 2008). Dieses Enzym, auch als CoTR bezeichnet, ist in der Lage Tropinon unspezifisch sowohl zu Tropin als auch zu Pseudotropin zu reduzieren und zusätzlich die entsprechenden Rückreaktionen zu katalysieren (Abb. 1.8). CoTR ist bisher die einzige SDR, welche aus einer Brassicaceae isoliert wurde und eine klare TR-Funktionalität aufweist.

Im Genom der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*, ebenfalls eine Brassicaceae, konnten 16 Gene gefunden werden, die eine Sequenzidentität $\geq 50\%$ zu den bekannten Tropinonreduktasen aufweisen. Die resultierenden Proteine werden aus diesem Grund als Tropinonreduktase-ähnliche Enzyme (Tropinone reductase-like = TRL) bezeichnet und ebenfalls der SDR-Unterfamilie SDR65C zugeordnet (Navarro-Quezada, 2007; Reinhardt et al., 2014;

1 Einleitung

Reinhardt, 2014). Im Gegensatz zu *C. officinalis*, die sowohl das Tropanalkaloid Cochlearin (Liebisch et al., 1973) als auch verschiedene Calystegine beinhaltet (Brock et al., 2006), konnten für *A. thaliana* keine Tropanalkaloide (Brock et al., 2006) nachgewiesen werden. Es stellte sich also die Frage nach der Aktivität und den potenziellen Substraten dieser Enzyme.

Dieser Frage wurde in zwei kooperativen Dissertationen an der Martin-Luther-Universität und am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle nachgegangen (Reinhardt, 2014; Fischer, 2015). N. REINHARDT untersuchte in ihrer Arbeit sieben der 16 potenziellen TRL-Enzyme aus *A. thaliana*, die durch folgende Gene codiert werden: At5g06060, At2g29260, At2g29150, At2g29170, At2g29360, At2g29350 und At2g29330. Die Bezeichnung der einzelnen Enzyme erfolgte analog den entsprechenden Genloci. Die Untersuchung erfolgte im Vergleich zu CoTR (Brock et al., 2008; Brock, 2008). Die Enzyme aus *A. thaliana* sind in der Uniprot-Datenbank als homologe Tropinonreduktasen beschrieben. Das Protein At2g29350 trägt zusätzlich die Bezeichnung SAG 13 (Senescence-associated protein 13), da es an der Seneszenz der Pflanze beteiligt ist (Weaver et al., 1998; Schippers et al., 2008). Die Proteine wurden auf ihre Cosubstratspezifität sowie auf ihre katalytischen Eigenschaften gegenüber potenziellen natürlichen Substraten untersucht. Parallel zu dieser Arbeit erstellte J. FISCHER Homologiemodelle für die drei Proteine At2g29150, At2g29350 und At2g29330 und optimierte das Modell von CoTR aus der Arbeit von A. BROCK (2008). Die Modelle gründen allgemein auf einem auf Homologie basierenden Strukturmodellierung unter Verwendung von Kristallstrukturen. Die Homologiemodelle der TRL und CoTR beruhen auf der Kristallstruktur von DsTRII (PDB-Code: 1IPF; Yamashita et al., 2003) und sind in Abbildung 6.12 im Anhang gezeigt. Aus den Modellstrukturen und ersten Erkenntnissen über als Substrate akzeptierte Verbindungen wurden Pharmacophore abgeleitet und ermöglichten ein virtuelles Screening von kleinen Molekülen, um weitere potenzielle Substrate für die Enzyme zu finden (Reinhardt et al., 2014; Fischer, 2015). Die untersuchten TRL-Enzyme aus *A. thaliana* sowie CoTR ließen sich in guten Ausbeuten rekombinant herstellen und zeigten breite Substratspektren. Diese umfassten kleine lipophile und zyklische Carbonylverbindungen sowie Monoterpene und Steroidverbindungen. Neben der Reduktion wurde zudem die Oxidation untersucht. Für verschiedene Umsetzungen konnten hohe Stereoselektivitäten ermittelt werden. Die Cosubstratspezifitäten der Enzyme entsprachen weitestgehend den aus der Sequenzinformation resultierenden Erwartungen (Kallberg et al., 2002).

1 Einleitung

1.5 Zielsetzung der Arbeit

At2g29350 und CoTR zeichneten sich in den vorhergehenden Arbeiten durch besonders breite Substratspektren und hohe katalytische Aktivitäten aus (Reinhardt, 2014; Fischer, 2015). In Kombination mit der guten Ausbeute als rekombinante Proteine in *E. coli* besitzen diese beiden Enzyme ein hohes Potenzial als Biokatalysatoren für industrielle Anwendungen und stehen im Fokus dieser Arbeit. Auf Basis der Vorarbeiten war es die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit, molekulare und biochemische Grundlagen für einen Einsatz der beiden Enzyme als Biokatalysatoren zu erarbeiten. Dabei wurden folgende, für eine künftige Anwendung essenzielle Aspekte bearbeitet:

1) Optimierung der Cosubstratpräferenz

At2g29350 zeigte in den vorherigen Studien eine strikte Cosubstratspezifität für NADPH. CoTR hingegen wies eine Aktivität mit NADPH und NADH auf, jedoch mit einer höheren Affinität zu NADPH (Reinhardt, 2014). Ziel der Optimierung war es aus At2g29350 ein mit NADH aktives bzw. NADH/NADPH-abhängiges Enzym zu erhalten und die NADH-Affinität von CoTR zu erhöhen. Aufgrund der hohen Konservierung der Rossmann-Faltung innerhalb der SDR sollten die Untersuchungen zur Cosubstratpräferenz durch ein modellgesteuertes Proteindesign mit den vorhandenen Homologiemodellen (Fischer, 2015; Abb. 6.12, Anhang) für At2g29350 und CoTR erfolgen. Praktisch sollten sowohl Mutagenesestudien als auch chimäre Proteine zum Einsatz kommen. Das Tropinon-Analogon 3-Methylcyclohexanon (3MCH) und sein Reduktionsprodukt 3-Methylcyclohexanol (3MCHol) dienten als Substrate bei der Charakterisierung der Enzymvarianten und Chimären (Abb. 1.9).

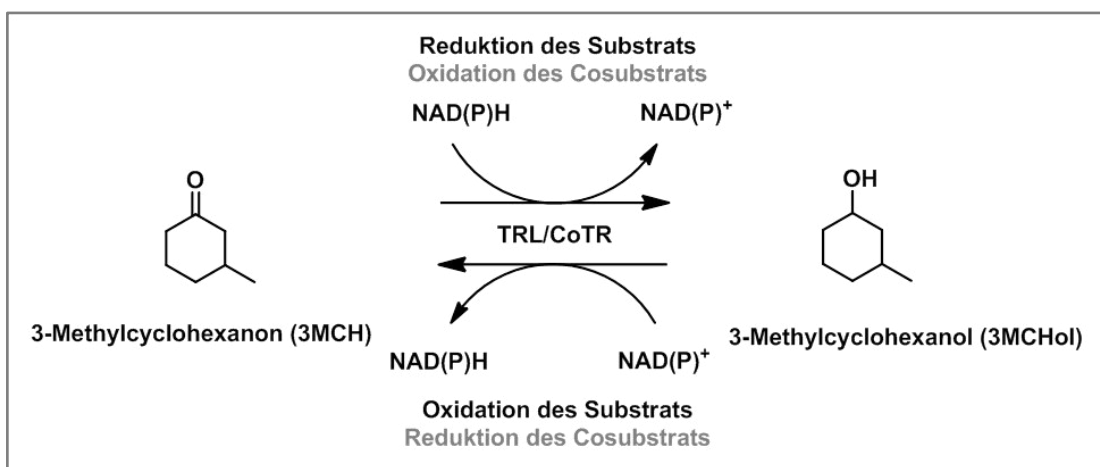


Abb. 1.9: Schematische Darstellung der Reduktion von 3-Methylcyclohexanon (3MCH) und der Rückreaktion ausgehend vom 3-Methylcyclohexanol (3MCHol).

1 Einleitung

2) Identifizierung anwendungsrelevanter Substrate

Das Augenmerk bei den Substraten für die SDR lag in den vorherigen Arbeiten (Reinhardt, 2014; Fischer, 2015) auf natürlich vorkommenden Verbindungen. Für die vorliegende Arbeit sollten jedoch Substrate gefunden werden, die eine unmittelbare Bedeutung in der chemischen Synthese haben. Für die Identifizierung von anwendungsrelevanten Substraten wurden Verbindungen aus dem Pharmacophoren-Screening basierend auf dem Homologiemodell von At2g29350 erneut analysiert.

3) Mechanismen von Substratbindung und Produktbildung

Mit den anwendungsrelevanten Substraten sollten dann die Mechanismen der Substratbindung und der Produktbildung untersucht werden. Für diese Untersuchungen waren die Homologie-Modelle der TRL und von CoTR nicht ausreichend, da zum einen die Substratbindetasche innerhalb der SDR der Bereich der geringsten Konservierung ist, zum anderen weisen die TRL und CoTR im Vergleich zu der Sequenz von DsTRII (Template für Modelle) genau in dem wichtigen Bereich der Helix $\alpha G'$ (Abb. 1.4; Abb. 6.11, Anhang) einen Gap von vier Aminosäuren auf. Folglich sollte in dieser Arbeit für die Untersuchung der Substratbindetasche versucht werden, Kristallstrukturen der beiden Enzyme At2g29350 und CoTR zu erhalten. Auf Basis der Kristallstrukturen könnten zudem Strategien zur Optimierung der Produktbildung entwickelt und weitere potenzielle Anwendungen gefunden werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 *Escherichia coli* Stämme

Tab. 2.1: Verwendete Bakterienstämme.

Bakterienstamm (Hersteller)	Genotyp	Verwendung
XL1-Blue (Stratagene)	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^qΔM15 Tn10</i> (Tet ^R)]	Plasmid-Amplifikation
XL2-Blue (Stratagene)	<i>endA1 supE44 thi-1 hsdR17recA1 gyrA96 relA1 lac</i> [F' <i>proABlacI^qΔM15Tn10</i> (Tet ^R)Amy Cam ^R]	Plasmid-Amplifikation
M15[pREP4] (QIAGEN)	NaI ^S , Str ^S , Rif ^S , Thi ⁻ , Lac ⁻ , Ara ⁺ , Gal ⁺ , Mtl ⁻ , F ⁻ , RecA ⁺ , Uvr ⁺ , Lon ⁺ ; (Kan ^R) [pREP4]	Heterologe Proteinproduktion
Rosetta-gami (DE3) (Novagen)	Δ (<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoA</i> <i>PvuII</i> <i>phoR</i> <i>araD139</i> <i>ahpC galE galK rpsL</i> (DE3) F' [<i>lac+</i> <i>lacI^q</i> <i>pro</i>] <i>gor522::Tn10</i> <i>trxB</i> pRARE (Cam ^R , Kan ^R , Str ^R , Tet ^R)	Heterologe Proteinproduktion

2.1.2 Klonierungsvektoren

Tab. 2.2: Leerplasmide und verwendete *E. coli* Stämme. (N) = N-terminal, (C) = C-terminal

Plasmid (Hersteller)	Eigenschaften	<i>E. coli</i> Stämme
pQE30 (QIAGEN)	Expressionsplasmid, 3461 bp, His-Tag (N), Ampicillinresistenz	XL1, XL2, M15
pET21d(+) (Novagen)	Expressionsplasmid, 5440 bp, T7-Tag (N), His-Tag (C), Ampicillinresistenz	XL1, XL2, Rosetta-gami
pGEM [®] -T Easy (Promega)	T-Überhang-Klonierungsvektor für PCR-Fragmente, 3015 bp, Ampicillinresistenz	XL2

2.1.3 Rekombinante Plasmide

Tab. 2.3: Rekombinante Plasmide aus der Arbeit von N. REINHARDT (2014).

UniProt	Plasmid	Protein	Restriktionsstellen	Anmerkung
Q9ZW18	pQE30-At2g29350	At2g29350	N-terminal: <i>SphI</i> C-terminal: <i>PstI</i>	erstes N-terminales ATG durch <i>SphI</i> ersetzt
Q9ZW19	pQE30-At2g29360	At2g29360	N-terminal: <i>BamHI</i> C-terminal: <i>SalI</i>	erstes N-terminales ATG durch <i>BamHI</i> ersetzt
A7DY56	pET21d(+)-CoTR	CoTR	N-terminal: <i>NcoI</i> C-terminal: <i>XhoI</i>	erstes N-terminales ATG(G) zu <i>NcoI</i> erweitert, Stopp-Codon durch <i>XhoI</i> ersetzt

2 Material und Methoden

2.1.4 Oligonukleotid-Primer

Tab. 2.4: Oligonukleotid-Primer für die Mutagenese-PCR (1.-12.) zur Darstellung der Enzymvarianten. Die Primer wurden lyophilisiert von Eurofins MWG Operon bezogen und mit DEPC-Wasser 0,1% (V/V) auf eine Stammkonzentration von 100 pmol/μL eingestellt. (*) Primer auch für die entsprechenden Chimärenvarianten verwendet.

	Primer	Nukleotidsequenz
1.	M350A48Dfor M350A48Drev	5'-gtccacacgtgtgacagagacgaaactcagc-3' 5'-gctgagtttcgtctctgtcacacgtgtggac-3'
2.	M350K27Sfor M350K27Srev	5'-gtcactgggtggctctagcggcatcggggaagc-3' 5'-gcttccccgatgccgctagagccaccagtgc-3'
3.	M350S26AK27Sfor M350S26AK27Srev	5'-gtcactgggtggcgctagcggcatcgggg-3' 5'-ccccgatgccgctagcggccaccagtgc-3'
4.	M350S26Afor M350S26Arev	5'-cttgtcactgggtggcgctaaaggcatcgggg-3' 5'-ccccgatgccttttagcggccaccagtgc-3'
5.	M350R49Ifor M350R49Irev	5'-gtccacacgtgtgacatagacgaaactcagcttc-3' 5'-gaagctgagtttcgtctatgtcacacgtgtggac-3'
6.	M350A48DD50Afor M350A48DD50Arev	5'-ccacacgtgtgacagagccgaaactcagcttcaag-3' 5'-cttgaagctgagtttcggctctgtcacacgtgtgg-3'
7.	M350V103Afor M350V103Arev	5'-catcctcgtcaacaatgcccgaacgtcaatattc-3' 5'-gaatattgacgttcccgcattgttgacgaggatg-3'
8.*	MCoTRA49Dfor MCoTRA49Drev	5'-gcaagagtccacacatgtgacagagacgaaactcagcttc-3' 5'-gaagctgagtttcgtctctgtcacatgtgtggactcttgc-3'
9.*	MCoTRS27Afor MCoTRS27Arev	5'-cttggtactgggtggcgccaaaggcatcggag-3' 5'-ctccgatgcctttggcgccaccagtaacaag-3'
10.	MCoTRA206Sfor MCoTRA206Srev	5'-gtgtccagggttcatatcaactcctttatcttccaattatcttag-3' 5'-ctaaaataattggaagataaaggagttgatatgaaccctggacac-3'
11.	M360A49Dfor M360A49Drev	5'-ggcaagaatccacacatgtgacagagacgaaactcagc-3' 5'-gctgagtttcgtctctgtcacatgtgtggattcttggc-3'
12.	M360S27Afor M360S27Arev	5'-cttgtcaccgggtggcgcaaaaggcatcggag-3' 5'-ctccgatgccttttggcgccaccgggtgacaag-3'

Tab. 2.5: Oligonukleotid-Primer für die Mutagenese-PCR (13.-18.) und die PCR unter Verwendung der MyFi™-Taq-DNA Polymerase (19.-20.) zur Darstellung der chimären SDR-Enzyme. Die Primer wurden lyophilisiert von Eurofins MWG Operon bezogen und mit DEPC-Wasser 0,1% (V/V) auf eine Stammkonzentration von 100 pmol/μL eingestellt.

	Primer	Nukleotidsequenz
13.	M350P110Sfor M350P110Srev	5'-gggaacgtcaatattcaagtcgaccacagagtatacag-3' 5'-ctgtataactctgtggctgcacttgaatattgacgttccc-3'
14.	M350V161Afor M350V161Arev	5'-gctggagtcgtgcatgccaatgttggatccatc-3' 5'-gatggatccaacattggcatgcacgactccagc-3'
15.	MCG1S111Pfor MCG1S111Prev	5'-cgggaaacatgtataacaaagccgaccacagagtatac-3' 5'-gtataactctgtggctggcctttgttatacatgttccc-3'

2 Material und Methoden

Fortsetzung Tab. 2.5

	Primer	Nukleotidsequenz
16.	MCG1T109FS111Pf MCG1T109FS111Pr	5'-gtgaacaatgcggaacatgtatattcaagccgaccacagagtatac-3' 5'-gtatactctgtggctcggtgaatatacatgttcccgcattgttcac-3'
17.	MCG2A162Vfor MCG2A162Vrev	5'-gttgctagtggttgatgtcaatggttgatccatc-3' 5'-gatggatccaacattgacatgcacaacactagcaac-3'
18.	MCG2T109Ffor MCG2T109Frev	5'-gtgaacaatgcggaacatgtatattcaagccgaccatagac-3' 5'-gtctatggctcggtgaatatacatgttcccgcattgttcac-3'
19.	CoTR_SphI_+1b CoTR_SalI_rev	5'-gtagcatgcgctaatttaagagagagctc-3' 5'-gtagtcgactttgttatacatgttcc-3'
20.	CoTR_SphI_vorn CoTR_SphI_mitte	5'-gtagcatgcgctaatttaagagagagctcgagagac-3' 5'-gtagcatgcacaacactagcaacggaaga-3'

2.1.5 Kultivierungsmedien für *E. coli*

Tab. 2.6: Verwendete Kultivierungsmedien für *E. coli*.

LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)	TB-Medium (Terrific Broth-Medium)	SOC-Medium
1,0% Trypton	1,2% Trypton	2,0% Trypton
0,5% Hefeextrakt	2,4% Hefeextrakt	0,5% Hefeextrakt
1,0% NaCl	0,4% Glycerol	10 mM NaCl
~ pH 7,0	~ pH 7,0	2,5 mM KCl
Für festes Nährmedium: zusätzlich 1,5% Agar		10 mM MgCl ₂
		10 mM MgSO ₄
		20 mM Glukose

2.1.6 Chemikalien

Alle Chemikalien stammen überwiegend von den Firmen ABCR, ACROS, ALFA AESAR, APPLICHEM, SIGMA-ALDRICH (FLUKA), MERCK und ROTH. Eine detaillierte Auflistung der Feinchemikalien mit Hersteller und Reinheitsgrad befindet sich im Anhang (Tab. 6.1).

2.1.7 Geräte und Software

Die verwendeten Analysegeräte und Software-Pakete sind bei den jeweiligen Methoden angegeben und die verwendeten Standardgeräte sind in Tabelle 6.2 im Anhang aufgelistet.

2.2 Methoden

2.2.1 Transformation und Kultivierung von Bakterien

2.2.1.1 Transformation kompetenter Zellen

Chemisch kompetente Zellen von *E. coli* wurden durch Behandlung mit Salzen nach dem Protokoll von NewEnglandBioLabs für die Herstellung von DH5 α TM kompetenten Zellen erzeugt. Die kompetenten Zellen wurden nach der Vorschrift im TA Cloning[®] Kit-Manual (Invitrogen) transformiert. Dafür wurden die Zellen entweder mit 3 μ L PCR-Ansatz oder Plasmidpräparation für 30 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurden die Ansätze für 30 s auf 42 °C erwärmt und dann wieder auf Eis gekühlt. Nach Zugabe von 250 μ L SOC-Medium wurden die Ansätze für 1-2 h bei 37 °C und unter sanftem Schütteln (700 rpm) inkubiert. 50-150 μ L der Ansätze wurden anschließend auf antibiotikahaltige LB-Agar-Platten (25 μ g/mL Kanamycin und/oder 50 μ g/mL Ampicillin) ausgestrichen und bei 37 °C im Brutschrank über Nacht inkubiert.

2.2.1.2 Kultivierung von Bakterien

Für die Herstellung der Flüssigkulturen für die Isolierung von Plasmid-DNA und das Animpfen von Expressionsansätzen wurden 3 mL bzw. 50 mL LB-Medium mit 25 μ g/mL Kanamycin und/oder 50 μ g/mL Ampicillin versetzt und mit der entsprechenden Bakterienkolonie oder Glycerolkultur angeimpft. Die Flüssigkulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Zur Lagerung von neu hergestellten Transformanten wurden Erhaltungskulturen angesetzt. Dazu wurden 20% steriles Glycerol zu den Flüssigkulturen gegeben und die Kulturen anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Isolation, Trennung und Reinigung von DNA

2.2.2.1 Trennung von DNA-Fragmenten über Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese diente zur Kontrolle und zur Auftrennung von Fragmenten aus PCR-, Restriktions- und Ligationsansätzen. Dafür wurden 1,5%-Agarose-Gele (w/V) in TAE-Puffer (40 mM Tris-Base, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7,6) hergestellt und mit 0,1-0,2 μ g/mL EtBr (1% wässrige Lösung (10 mg/mL) von Roth, 1:10 verdünnt) versetzt. Unter Zugabe von 1-2 μ L Ladepuffer (200 mM EDTA, 50% Glycerol, 0,2% Bromphenolblau) wurden die Proben auf die Gele geladen und die Fragmente nach ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld bei einer Spannung von 70 V aufgetrennt. Die Detektion der Ban-

2 Material und Methoden

den erfolgt durch die Interkalation des EtBr in die DNA und die sichtbare Fluoreszenz bei 312 nm. Als Größenmarker diente der GeneRuler™ DNA Ladder Mix (100-10000 bp, Thermo Fisher Scientific).

2.2.2.2 Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen und aus Lösungen

Nach Auftrennung über die Agarosegelelektrophorese wurden die DNA-Banden anhand ihrer Fluoreszenz aus dem Gel ausgeschnitten und mit dem MinElute® Gel Extraktion Kit (Qiagen) oder dem QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben extrahiert und gereinigt.

Über PCR amplifizierte DNA-Fragmente wurden mit dem MinElute® Purification Kit (Qiagen) entsprechend der Herstellerangaben gereinigt.

2.2.2.3 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Von angezogenen Flüssigkulturen wurden 2 mL abgenommen, in ein 2 mL Eppendorfgefäß überführt und 15 min bei 4 °C und 13000 rpm zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde aus dem Zellpellet nach alkalischem Aufschluss durch selektive Adsorption an eine Silica-Matrix gereinigt (GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit, Thermo Fisher Scientific). Die Plasmid-DNA wurde in 30 µL Wasser oder mit dem Elutionspuffer des Miniprep Kits eluiert.

2.2.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration und -Reinheit

Die Bestimmung der Konzentration der doppelsträngigen Plasmid-DNA erfolgte photometrisch mit einem Einstrahlphotometer unter Verwendung der Eppendorf µCuvette® G1.0. Dazu wurden zuerst 3 µL des verwendeten Lösungsmittels als Blankprobe vermessen und anschließend 3 µL der entsprechenden DNA-Lösung. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei 260 nm. Die DNA-Konzentration wurde direkt durch das Gerät über die Gleichung $c = A \cdot F$ errechnet (c = Konzentration, A = Absorption, F = Faktor). Der Faktor für doppelsträngige DNA beträgt 50 µg/mL (entspricht: $A = 1$). Zusätzlich wurde die Proteinkonzentration bei 280 nm ermittelt und durch die Erhebung des Quotienten $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ die Reinheit der Plasmid-DNA bestimmt (Soll-Wert: 1,5-2).

2 Material und Methoden

2.2.3 Enzymatische Modifikation von DNA

2.2.3.1 Mutagenese-Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR)

Die Mutagenese-PCR wurde für die Mutagenese-Studien und den damit verbundenen ortsgerichteten Austausch von Nukleotiden in verschiedenen rekombinanten Plasmiden eingesetzt. Zudem wurden über Mutationen gezielt Restriktionsschnittstellen in die Wildtypsequenzen für die Darstellung der Chimären eingeführt. Für die Mutagenese-Studien und die Darstellung der Chimären standen die rekombinanten Plasmide aus der Arbeit von N.REINHARDT (2014) als Templates zur Verfügung (Tab. 2.3). Für die Planung der Oligonukleotid-Primer und die Durchführung der Mutagenese-PCR wurde nach dem Protokoll des QuikChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) gearbeitet. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2.4 und 2.5 (1.-18.) aufgelistet. 25 ng des jeweiligen Templates wurden mit 1,25 U Pfu DNA Polymerase (native, 2,5 U/μL, Thermo Fisher Scientific), 0,2 μM des jeweiligen Primers (for/rev), 0,25 mM von dATP, dTTP, dGTP und dCTP und 2,5 μL Pfu Puffer (10x, mit MgSO₄) in einem Gesamtvolumen von 25 μL (DEPC-Wasser 0,1% (V/V)) zusammengefügt. Nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 30 s, erfolgten 16 Zyklen mit einer Denaturierung bei 95 °C für 30 s, einer Annealing Phase bei 55 °C für 1 min und einer anschließenden Elongation bei 68 °C für 6 min. Danach wurde die Reaktion bei 0 °C gekühlt. Da die erhaltene Doppelstrang-DNA durch die Mutagenese-PCR unter Einführung der gewünschten Mutation vollständig amplifiziert, aber nicht methyliert wurde, konnte durch einen anschließenden Verdau der methylierten Template-DNA mit 5 U DpnI (10 U/μL, Thermo Fisher Scientific) für 3 h bei 37 °C die mutierte DNA von der Template-DNA getrennt werden.

2.2.3.2 Herstellung der chimären Gene

Die chimären Gene 1 und 2 (CG1 und CG2) und die dafür benötigten Oligonukleotid-Primer (Tab. 2.5) wurden mit dem Programm Clone Manager (Scientific & Educational Software) geplant. Die benötigten Restriktionsschnittstellen in der Nukleotidsequenz des Wildtyp-Enzyms At2g29350 wurden über Mutagenese-PCR eingefügt (Primerpaare 13. und 14.; Tab. 2.5).

Die Genfragmente Insert-CoTR(CG1) und Insert-CoTR(CG2) wurden unter Verwendung der MyFi™-Taq-DNA Polymerase (Biolone) zusammen mit Primern mit Sequenzüberhang so amplifiziert, dass die Genfragmente sowohl am N- als auch am C-terminalen Ende, die für den Einbau in die Sequenz von At2g29350 benötigten, Restriktionsschnittstellen aufwiesen. Die MyFi™-Taq-DNA Polymerase ist zudem in der Lage an den Enden der amplifizierten

2 Material und Methoden

Genfragmente zusätzlich das für ein TA-Kloning benötigte Nukleotid A anzuhängen. Die Zusammensetzung der PCR-Ansätze entspricht dem Bioline-Protokoll. Für die PCR-Ansätze wurden 200 ng des Templates (pET21d(+)-CoTR; Tab. 2.3) mit 4 U der MyFiTM-Taq-DNA Polymerase (2 U/ μ L), 20 μ M des jeweiligen Primers (Primerpaare: CG1: 19.; CG2: 20.) und 10 μ L MyFiTM-Reaktionspuffer (5x) in einem Gesamtvolumen von 50 μ L (DEPC-Wasser 0,1% (V/V)) zusammengefügt. Nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 1 min, erfolgten 30 Zyklen mit einer Denaturierung bei 95 °C für 15 s, einer Annealing Phase bei 49 °C (Primerpaar 19.) bzw. 56 °C (Primerpaar 20.) für 15 s und einer anschließenden Elongation bei 72 °C für 15 s. Anschließend wurde die Reaktion 5 min bei 72 °C inkubiert und dann auf 12 °C gekühlt. Zuletzt wurden die Genfragmente gereinigt.

Das Zwischenklonieren der amplifizierten Genfragmente von CoTR (Insert-CoTR(CG1) und Insert-CoTR(CG2)) erfolgte über TA-Kloning in den pGEM[®]-T Easy Vektor unter Verwendung des pGEM[®]-T Easy Kits (Promega). Im Kit enthalten sind der offene pGEM[®]-T Easy Vektor sowie die T4 DNA Ligase (3 U/ μ L). Das molare Insert:Vektor-Verhältnis wurde entsprechend dem Promega-Protokoll ermittelt. Die Ligationansätze des TA-Klonings beinhalteten 50 ng des pGEM[®]-T Easy Vektors, ca. 17 ng des Insert-CoTR(CG1) bzw. ca. 24,5 ng des Insert-CoTR(CG2), 3 U T4 DNA Ligase (3 U/ μ L) und 5 μ L Rapid Ligation Puffer (2x) in einem Gesamtvolumen von 10 μ L. Die Ligationansätze wurden über Nacht bei 14 °C inkubiert und bei 65 °C (15 min) gestoppt. Das TA-Kloning wurde über einen Testverdau kontrolliert. Die Restriktionsansätze bestanden aus 200-300 ng Plasmid, 5 U EcoRI (10 U/ μ L, Thermo Fisher Scientific) und 2 μ L Tango-Puffer (10x, mit BSA, Thermo Fisher Scientific) in einem Gesamtvolumen von 10 μ L (DEPC-Wasser 0,1% (V/V)). Die Ansätze wurden bei 37 °C für 2 h inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze über Agarosegelelektrophorese kontrolliert und positive Plasmide sequenziert.

Für die Herstellung der chimären Genkonstrukte mittels Ligation mussten die entsprechenden Vektor- und Insert-Fragmente über Restriktion hergestellt werden. Der Restriktionsverdau für CG1 wurde mit dem DoubleDigest Calculator von Thermo Fisher Scientific geplant. Zuerst wurden jeweils 1,5 μ g der Konstrukte At2g29350(P110S)/pQE30 und Insert-CoTR(CG1)/pGEM[®]-T Easy zusammen mit 5 U SphI (10 U/ μ L, Thermo Fisher Scientific) und 1 μ L Tango-Puffer (10x mit BSA, Thermo Fisher Scientific) in einem Volumen von 10 μ L (DEPC-Wasser 0,1% (V/V)) 1 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze mit 10 U Sall (10 U/ μ L, Thermo Fisher Scientific), 3 μ L Tango-Puffer und DEPC-Wasser auf 20 μ L erweitert und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Für den Restriktionsverdau für CG2 wurden 3 μ g des

2 Material und Methoden

Konstruktes At2g29350(V161A)/pQE30 und 6 µg des Konstruktes Insert-CoTR(CG1)-/pGEM[®]-T Easy mit 30 U bzw. 60 U des Enzyms SphI (10 U/µL, Thermo Fisher Scientific) mit jeweils 4 µL von Puffer B (10x mit BSA, Thermo Fisher Scientific) in einem Gesamtvolumen von 40 µL über 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Restriktionsansätze wurden anschließend über Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und gereinigt.

Um während der Ligation zusätzliche Verknüpfungen zu vermindern, wurden die At2g29350-(P110S)/pQE30- und At2g29350(V161A)/pQE30-Fragmente dephosphoryliert. Dazu wurde die Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, 1 U/µL, Thermo Fisher Scientific) eingesetzt. 15 µL Plasmid-Extrakt wurden mit 1,9 µL SAP-Puffer (10x) versetzt und 1,9 U SAP hinzugegeben. Die Ansätze wurden 30 min bei 37 °C inkubiert und im Anschluss bei 65 °C (15 min) abgestoppt.

Die Ligationen der Konstrukt-Fragmente für die Herstellung der Chimären wurden in Anlehnung an das TA-Kloning mit dem pGEM[®]-T Easy Kit (Promega) durchgeführt. Als Vektor (50 ng) dienten die, über Restriktion und Desphosphorylierung erhaltenen At2g29350(P110S)-/pQE30- und At2g29350(V161A)/pQE30-Fragmente und als Insert, die über die Restriktion erhaltenen Insert-CoTR(CG1)- und Insert-CoTR(CG1)-Fragmente (ca. 5 ng und 20 ng).

Im Anschluss an die Ligation wurde durch Kolonie-PCR überprüft, ob bei der Herstellung von CG2 das Insert-CoTR(CG2)-Fragment in Leserichtung in das At2g29350(V161A)-/pQE30-Fragment ligiert worden war. Für die Kolonie-PCR wurde zuerst aus mehreren Kolonien eine Sektorplatte angesetzt und diese über Nacht bei 37 °C inkubiert. Von der Sektorplatte wurde dann für jede Kolonie etwas abgenommen und in jeweils 15 µL entionisiertem Wasser suspendiert. Für die Lyse wurden die Suspensionen 5 min bei 95 °C inkubiert. Für die eigentliche Kolonie-PCR wurde der MangoMix[™] von Bioline eingesetzt. Dieser enthält neben der MangoTaq[™]-DNA Polymerase alle nötigen Komponenten für die PCR (u.a. Puffer und dNTP). Als Primer dienten zum einen der Vorwärts-Primer zur Amplifizierung des CoTR-Inserts (Primer: CoTR_SphI_vorn; Tab. 2.5, 20.) sowie der Rückwärtsprimer für die Amplifizierung des Gens von At2g29350 aus der Arbeit von N.REINHARDT (At2g29350REV, 2014). War das Insert-CoTR(CG2)-Fragment in Leserichtung im At2g29350(V161A)/pQE30-Fragment ligiert, resultierte mit diesen Primern das vollständige chimäre Gen. Für die Kolonie-PCR-Ansätze wurden 4 µL der lysierten Kolonielösungen mit 10 µL MangoMix[™] und 10 µM des jeweiligen Primers in einem Gesamtvolumen von 20 µL (DEPC-Wasser 0,1% (V/V)) zusammengefügt. Nach einer initialen Denaturierung bei 95 °C für 2 min, erfolgten 30 Zyklen mit einer Denaturierung bei 95 °C für 15 s, einer Annealing Phase bei 59 °C für 30 s

2 Material und Methoden

und einer anschließenden Elongation bei 72 °C für 40 s. Anschließend wurde die Reaktion 5 min bei 72 °C inkubiert und danach auf 12 °C gekühlt. Die Kolonie-PCR-Produkte wurden anschließend über Agarosegelelektrophorese analysiert.

Zuletzt wurden über Mutagenese-PCR die eingefügten Restriktionsschnittstellen aus den chimären Genen entfernt (Primerpaare 15. und 17.; Tab. 2.5).

2.2.3.3 Sequenzanalyse zur Überprüfung der Plasmid-DNA

Um den korrekten Einbau von Mutationsstellen und die Sequenzen der Chimären zu überprüfen, wurden die Gene sequenziert. Dazu wurde der Service von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) nach Herstellerangaben in Anspruch genommen. Die Auswertung der Sequenzierungen erfolgte mittels Alignment der erhaltenen Nukleinsäure-Sequenzen über das ClustalW2-Tool von EMBL-EBI (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) mit den benötigten Ziel-Sequenzen.

2.2.4 Biochemische Methoden

2.2.4.1 Heterologe Proteinproduktion in *E. coli*

Die Proteinproduktion der Wildtyp-Enzyme und Enzymvarianten erfolgte in TB-Medium. Zum Kultivierungsmedium wurden 50 µg/mL Ampicillin und 4% der Füllmenge an Flüssigkultur gegeben. Anschließend wurde bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Nach 4 h (*E. coli* Rosetta-gami) bzw. 2,5 h (*E. coli* M15) wurde die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) überprüft. War die logarithmische Wachstumsphase (OD₆₀₀ = 0,6-1,0) erreicht, wurde durch Zusatz von IPTG (1 mM) induziert. Die Kolben wurden 4,5 h bei 37 °C und 250 rpm inkubiert. Die Zellpellets (ein Pellet aus je 250 mL Bakterienkultur) wurden durch Zentrifugation bei 4 °C und 5.000 rpm für 10 min gewonnen und bis zur Proteinaufreinigung bei -80°C gelagert.

2.2.4.2 Proteinreinigung mittels immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie

Für die Zellyse wurden die Bakterienpellets in Lysepuffer (10 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ x 2 H₂O, pH 8,0; filtriert (Membranfilter OE67, CA, 0,45 µm, Whatman)) resuspendiert. Pro Pellet wurden 10 mL Lysepuffer eingesetzt (Ausnahme: Enzymvarianten von At2g29350 → 20 mL). Pro 10 mL Lysepuffer wurden dann 75 µL Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma Aldrich) hinzugefügt. Der Zellaufschluss erfolgte mit Lysozymlösung (10 mg Lysozym/mL Lysepuffer; Lysozym: Molecular biology grade, 22770 U/mg, Applichem). Zu jedem resuspendiertem Pellet wurde 1 mL Lysozymlösung gegeben (Ausnahme: Enzymvari-

2 Material und Methoden

anten von At2g29350 → 2 mL) und die Lyselösung für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lyselösung mit Ultraschall behandelt (pro resuspendiertem Pellet 90 s auf Eis). Danach wurden 50 µL DNase I (1 mg/ml, 5098,3 U/µL, Applichem; Lagerpuffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 50% Glycerol, 1 mM MgCl₂) pro resuspendiertem Pellet hinzugegeben (Ausnahme: Enzymvarianten von At2g29350 → 100 µL DNase I) und die Lösung für 8 min bei RT inkubiert. Die Zellbestandteile wurden bei 0 °C mit 13.000 rpm für 45 min abzentrifugiert und das Lysat partikelfrei filtriert (Whatman® Puradisc FP 30/0,45 CA-S). Die genauen Angaben für die einzelnen Aufreinigungen sind in Tabelle 6.3 im Anhang aufgeführt.

Die Aufreinigung erfolgte über selektive Adsorption 6xHis-fusionierter Proteine an Ni²⁺-Sepharose und nachfolgende Elution durch Imidazol. Um die Reinheit der Zielproteine zu erhöhen, wurde während der Elution ein Gradient mit ansteigender Imidazolkonzentration (10-500 mM) eingesetzt, wodurch unspezifisch und somit weniger festgebundene Bakterienproteine zuerst von der Säule verdrängt werden, bevor bei höherer Imidazolkonzentration die rekombinanten Proteine eluiert werden. Für die Metallionenaffinitätschromatographie stand das Proteinchromatografie-System ÄKTA explorer 100 (Pharmacia) mit der Software Unicorn™ 5.31 (GE Healthcare) zur Verfügung. In Tabelle 2.7 sind die Bedingungen und Parameter der Reinigungsläufe zusammengefasst.

Tab. 2.7: Bedingungen und Parameter der Metallionenaffinitätschromatographie.

Säule	His-Trap HP-Säule (GE Healthcare), Säulenvolumen 5 mL (1 mL), Dimension 16 x 25 mm (7 x 25 mm), stationäre Phase Ni-Sepharose, Metallion Ni ²⁺ , Partikelgröße 34 µm, Bindekapazität min. 40 mg His-Tag Protein
Flussrate	1 mL/min
Temperatur	20 °C
Equilibrierung	Bindepuffer
Probenaufgabe	50 mL Probenreservoir, 20-40 mL Probenvolumen (Tab. 6.4, Anhang)
Detektion	UV-Absorption bei 280 nm
Elution	linearer Gradient 10-500 mM Imidazol über 5-20 Säulenvolumen (SV) (Tab. 6.4, Anhang) durch Mischung von Binde- und Elutionspuffer
Fraktionierung	2 mL ab Gradientenbeginn, auf Eis

Als Säulen wurden 5 mL His-Trap HP-Säulen (GE Healthcare) eingesetzt (Ausnahme: At2g29360 und At2g29330 → 1 mL Säule). Der verwendete Bindepuffer entsprach dem Lysepuffer. Der Elutionspuffer beinhaltete eine 50x höhere Imidazolkonzentration als der Bindepuffer (500 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ x 2 H₂O, pH 8,0; filtriert (Membranfilter OE67, CA, 0,45 µm, Whatman)) und die Elution erfolgte standardmäßig über

2 Material und Methoden

einen Gradienten von 5 Säulenvolumen (SV). Für einige Ansätze wurden zudem Gradienten von 10-15 SV verwendet. Bei der 1 mL Säule erfolgte die Elution über 20 SV. Das Probenvolumen betrug zwischen 20 und 40 mL. Die genauen Angaben für jede Reinigung sind in Tabelle 6.4 im Anhang angeben.

Da ein negativer Einfluss des Imidazols auf die Proteinaktivität nicht ausgeschlossen werden konnte, wurde der imidazolhaltige Puffer anschließend gegen den Standardlagerpuffer (20 mM KPP pH 7,0, 100 mM NaCl, 1 mM DTT (Zusatz vor Gebrauch), 22% Glycerol) ausgetauscht. Danach wurden Proteinfraktionen gleicher Reinheit vereint und die Proteine zur Lagerung bei -80 °C aliquotiert (250-500 µL).

2.2.4.3 Umpufferung und Aufkonzentrieren von Proteinlösungen

Für das Umpuffern von Proteinlösungen wurden PD-10-Säulen (Sephadex™ G-25, Pharmacia) verwendet, die nach dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie arbeiten. Die Säulen wurden bei 4 °C mit ca. 25 mL des Lagerpuffers (ohne Glycerol) equilibriert, mit 2,5 mL Proteinlösung beladen und das Protein mit 3,5 mL Lagerpuffer eluiert.

Für einige Anwendungen mussten die Proteinlösungen aufkonzentriert werden. Dafür wurden Amicon Ultra-15 Zentrifugen-Filtereinheiten (30.000 NMGG) der Firma Merck verwendet. Die Proteinlösungen wurden in die Filteraufsätze gefüllt und für ca. 15-20 min bei 4 °C zentrifugiert bis die gewünschte Konzentration erreicht war.

2.2.4.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurden zwei verschiedene Methoden angewandt. Enthielt der Lagerpuffer der Proteine kein DTT, wurde die Konzentration über die Absorption bei 280 nm bestimmt. War hingegen das bei 280 nm absorbierende DTT im Lagerpuffer enthalten, wurde die Methode nach Bradford genutzt.

Die Konzentrationsbestimmung bei 280 nm beruht auf der Absorption der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm. Für jedes Protein wurde unter Verwendung des ProtParam-Tools von ExPASy (web.expasy.org/protparam/) der proteinspezifische Extinktionskoeffizient (ϵ) anhand der Aminosäuresequenz ermittelt. Zusammen mit dem Molekulargewicht (M) der Proteine, kann über das Lambert-Beersche Gesetz ($c = (\Delta A / (\epsilon \cdot d)) \cdot M$) aus der gemessenen Absorption (ΔA) direkt die Proteinkonzentration (c) ermittelt werden. Für die Messung wurden zuerst 150-200 µL des Lagerpuffers als Referenz vermessen und anschließend dasselbe Volumen an Proteinlösung. Als Einmalküvetten wurde die UVette® (Schichtdicke $d = 1$ cm, Ep-

2 Material und Methoden

pendorf) verwendet. Hochkonzentrierte Proteinlösungen wurden vor der Messung verdünnt, sodass die Absorption zwischen 0,5-0,9 lag.

Bei der Konzentrationsbestimmung nach Bradford (1976) wird die Proteinkonzentration nicht direkt vermessen, sondern indirekt über eine Farbreaktion mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau. Durch die Bindung des Proteins über die basischen Aminosäuren Arginin und Lysin an den Farbstoff ändert sich das Absorptionsmaximum von 465 nm der protonierten braunroten und kationischen Form zu 595 nm der unprotonierten blauen und anionischen Form. Die benötigte Bradford-Lösung wurde als 4x Stammlösung hergestellt (400 mg Coomassie-Brilliant-Blau G-250, 400 mL Phosphorsäure 85%, 200 mL Ethanol 96%, 400 mL deionisiertes Wasser). Für die Messungen wurde die Lösung 1:4 mit deionisiertem Wasser verdünnt und jeweils 1 mL der Lösung in den Semi-Mikro-Küvetten (1,5 mL, Diagonal) vorgelegt. Für die Referenz wurden 50 µL des entsprechenden Lagerpuffers hinzugegeben und für die Probe 50 µL Proteinlösung. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden die Proben photometrisch vermessen. Die Auswertung erfolgte anhand einer mit BSA erstellten Kalibriergeraden über den Bereich von 0-250 µg/mL. Die Proteinkonzentration wurde über die gemessene Absorption berechnet und als Mittelwert aus einer Dreifachbestimmung angegeben.

2.2.4.5 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Mittels denaturierender SDS-PAGE (Laemmli, 1970) werden Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Diese Methode wurde zur Beurteilung der heterologen Proteinproduktion, der Proteinreinigung und der Gelfiltration eingesetzt. Dafür wurden die Proteinproben mit 2x-Probenpuffer (90 mM Tris/HCl pH 6,8, 20% (m/V) Glycerol, 2% (m/V) SDS, 0,02% (m/V) Bromphenolblau, 100 mM DTT) versetzt. Der Probenpuffer enthält Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate, SDS), welches als anionisches Detergenz die Eigenladung der Proteine überdeckt. Zudem kommt es durch Aufkochen der Proben im Probenpuffer bei 95 °C für 10 min zur Denaturierung der Proteine, wodurch die Proteine nur noch nach ihrem monomeren Molekulargewicht im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Als Größenmarker wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker von Thermo Fisher Scientific verwendet. Die verwendeten Gele enthielten 6,6% (V/V) Acrylamid im Sammelgel und 20% (V/V) Acrylamid im Trenngel (Tab. 2.8). Als Laufpuffer diente ein 1x Tris/Glycin-Puffer pH 8,3 (10x Laufpuffer: 30,2 g/L Tris-Base, 144,0 g/L Glycin, 10,0 g/L SDS; 1:10 mit deionisiertem Wasser verdünnt). Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 25 mA (Sammelgel) bzw. bei 40 mA (Trenngel) durchgeführt. Die Proteine wurden anschließend durch Coomassie-Färbung detektiert (Tab. 2.9).

2 Material und Methoden

Tab. 2.8: Zusammensetzung der SDS-Gele.

	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid	6,6%	20%
<i>N,N'</i> -Methylen-Bisacrylamid	0,177%	0,54%
Tris/HCl pH 6,8	125 mM	-
Tris/HCl pH 8,8	-	376 mM
SDS	0,1%	0,1%
TEMED	0,1%	0,3%
APS	0,05%	0,1%

Tab. 2.9: Coomassie-Färbung: Lösungen und Ablauf.

Schritt	Zusammensetzung der Lösungen	Zeit
1. Fixierung	50% Methanol, 1% Essigsäure	20 min
2. Färben	2 g Coomassie-Brilliant-Blau R-250, 425 ml Ethanol (96%), 50 ml Methanol 100 ml Essigsäure, 425 ml deionisiertes Wasser	30 min
3. Entfärben	2% Ethanol (96%), 10% Essigsäure 40% Methanol, 10% Essigsäure, 6% Glycerol	nach Bedarf 15 min

2.2.4.6 Massenspektrometrie/Proteomik

Die beiden Banden zwischen 25 kDa und 35 kDa auf dem SDS-Page-Gel von CoTR nach der Affinitätschromatographie wurden mittels LC-MS basierter Proteomik untersucht. Die Messungen wurden von Dr. W. Hoehenwarter (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, Abteilung Proteomanalytik) durchgeführt und ausgewertet. Dafür wurden ca. 3,34 µg der Proteinlösung über SDS-Page aufgetrennt und die beiden Banden ausgeschnitten. Nach einem Trypsin-Verdau wurden die Proben mit einem Orbitrap Velos Pro Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) vermessen. Die erhaltenen Ergebnisse wurden mit der Sequenz von CoTR und mit *E. coli*-Sequenzen (SwissProt) verglichen.

2.2.4.7 Analytische Ultrazentrifugation und Analytische Gelfiltration

Für die analytische Ultrazentrifugation und analytische Gelfiltration wurden Puffer benötigt, in welchen die Proteine über mehrere Stunden bei 20 °C stabil sind und die kein DTT enthalten, da dieses zum einen bei 280 nm absorbiert und zum anderen bei RT nicht stabil ist. Für At2g29350, At2g29350(S26A,A48D), At2g29360(S27A,A49D), CoTR, CG1 und CG2 wurde ein Kaliumphosphatpuffer (25 mM KPP pH 7,0, 125 mM NaCl, 0,5 mM TCEP) und für CoTR und CG2 zusätzlich ein Tris-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,5 mM

2 Material und Methoden

TCEP) getestet. Die Proteinlösungen wurden auf eine Konzentration von 0,3 mg/mL eingestellt. Es wurde eine t_0 -Probe genommen und die Proteine dann bei 20 °C über 6 h inkubiert. Alle 2 h wurde Protein entnommen und im jeweiligen Standardassay (Tab. 2.15) auf seine Aktivität überprüft.

Die analytische Ultrazentrifugation diente dazu das native Molekulargewicht (M) der Proteine bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen zu bestimmen. Die Messung beruht auf der unterschiedlichen Sedimentationsgeschwindigkeit und der unterschiedlichen Einstellung der Sedimentationsgleichgewichte von Proteinen abhängig von ihrem Molekulargewicht (Schuster and Toedt, 1996). Die Messungen an der Ultrazentrifuge wurden von Priv.-Doz. Dr. H. Lilie (MLU, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Technische Biochemie) durchgeführt und ausgewertet. Die Bedingungen und Parameter der Messungen sind in Tabelle 2.10 zusammengefasst. Die Proteinproben waren über den Zeitraum der Messungen stabil und zeigten keine Aggregation.

Tab. 2.10: Bedingungen und Parameter der analytischen Ultrazentrifugation.

Gerät	Ultrazentrifuge Optima XL-A (Beckmann), Doppelsektorzellen, AnTi 50 Rotor
Messpuffer	At2g29350 und Varianten, At2g29360(S27A,A49D), Chimären und Varianten: 25 mM KPP pH 7,0, 125 mM NaCl, 0,5 mM TCEP; CoTR und Varianten: 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,5 mM TCEP
Proteinkonzentration	0,3 und 0,04 mg/mL
Referenzlösung	entsprechend Messpuffer
Messungen	Sedimentationsgeschwindigkeit: 40.000 rpm, 3 h, 20 °C → s Sedimentationsgleichgewicht: 10.000 rpm, 20 °C → M(app)
Detektion	Aufzeichnung der Proteinabsorption bei 280 nm oder 230 nm
Auswertung	Berechnung der apparenten Sedimentationskonstante (s) und des apparenten Molekulargewichts (M(app)) mit Software Sedfit (Schuck, 2000)

Die analytische Gelfiltration wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, das native Molekulargewicht unter verschiedenen (Co-)Substratbedingungen zu ermitteln. Allgemein beruht die Gelfiltration auf dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie. Für oligomere Proteine bedeutet dies, dass Proteine mit einem höheren nativen Molekulargewicht (z.B. ein Tetramer) schneller durch die Säule gelangen als Proteine mit einem geringeren nativen Molekulargewicht (z.B. ein Dimer), da die kleineren Proteine stärker mit dem Säulenmaterial interagieren. Für die Gelfiltration stand das Proteinchromatografie-System ÄKTA explorer 100 (Pharmacia) mit der Software UnicornTM 5.31 (GE Healthcare) zur Verfügung. Die verwendeten Pa-

2 Material und Methoden

parameter sind in Tabelle 2.11 aufgelistet. Die Gelfiltration wurde mit At2g29350 und At2g29350(S26A,A48D) durchgeführt.

Der Puffer wurde für jeden Lauf mit der entsprechenden Substrat- und Cosubstratkonzentration frisch hergestellt (Tab. 2.12), filtriert (Membranfilter OE67, CA, 0,45 μ m, Whatman) und entgast. Im Anschluss wurde die Säule mit dem jeweiligen Puffer equilibriert. Die gelagerten Proteine im Standardlagerpuffer wurden vor jedem Lauf in den Kaliumphosphatpuffer (Tab 2.11) umgepuffert und auf die gewünschte Konzentration eingestellt. Vor Befüllung der Probenschleife wurde entsprechend der Ansätze 3MCH zu der Proteinlösung gegeben (Tab. 2.12).

Tab. 2.11: Verwendete Parameter und Bedingungen für die analytische Gelfiltration.

Säule	XK16/60 mit Sephacryl [®] S-200 HR (Betthöhe 59 cm, Bettvolumen 119 ml)
Flussrate	0,5 mL/min
Temperatur	20 °C
Equilibrierung	Kaliumphosphatpuffer (25 mM KPP pH 7,0, 125 mM NaCl, 0,5 mM TCEP) mit entsprechenden Substrat und Cosubstratkonzentrationen (Tab. 2.12)
Probenaufgabe	0,5 mL (Verwendung einer 0,5 mL Probenschleife)
Elution	isokratisch
Fraktionierung	2 mL Fraktionen, Start: 35 mL nach Probenauftrag
Detektion	UV-Absorption bei 280 nm und indirekt über SDS-Page

Tab. 2.12: Protein- sowie Cosubstrat- und Substratkonzentrationen für die Ansätze der analytischen Gelfiltration.

	Protein	c (Cosubstrat) [mM]		c (3MCH) [mM]	c (Protein) [mg/mL]
		NADPH	NADH		
1.	At2g29350	-	-	-	0,9
2.	At2g29350	0,3	-	-	0,9
3.	At2g29350	0,15	-	9	0,9
4.	At2g29350	0,9	-	9	0,9
1.	At2g29350(S26A,A48D)	-	-	-	1,44
2.	At2g29350(S26A,A48D)	-	3,5	-	1,44
3.	At2g29350(S26A,A48D)	-	0,4	13	1,44
4.	At2g29350(S26A,A48D)	-	0,8	13	1,44
5.	At2g29350(S26A,A48D)	-	3,5	25	1,44

Zur Auswertung wurde eine Kalibriergerade mit bekannten Standardproteinen erstellt. Dazu wurde das MW-GF-200-Kit von Sigma Aldrich verwendet. Die Kalibrierung wurde entsprechend dem Sigma-Protokoll durchgeführt. Als Puffer wurde der Kaliumphosphatpuffer (Tab.

2 Material und Methoden

2.11) verwendet. Das Ausschlussvolumen V_0 wurde mittels Dextranblau (2000 kDa) bestimmt. Für die Kalibriergerade wurde in den erhaltenen Chromatogrammen am Maximum der Proteinpeaks das Elutionsvolumen V_E ermittelt. Die dekadischen Logarithmen der Molekulargewichte wurden gegen den Quotienten aus V_E und V_0 für die Standardproteine aufgetragen. Die Kalibriergerade ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Die BSA-Messung wich sehr stark von der Geraden ab und wurde aus diesem Grund nicht für die Kalibrierung berücksichtigt. Da NAD(P)H und 3MCH wie die Proteine eine Absorption bei 280 nm zeigen, erfolgte die Auswertung der Probenläufe nicht über die Auswertung der UV-Chromatogramme sondern über das Auftragen der Fraktionen auf SDS-Page-Gele. Dafür wurden jeweils 50 μ L der einzelnen Fraktionen mit 50 μ L 2x Probenpuffer versetzt und erhitzt (95 °C, 10 min). Anhand der Intensität der Banden auf den SDS-Page-Gelen wurden die Elutionsmaxima ermittelt und über die Kalibriergerade in das native Molekulargewicht umgerechnet.

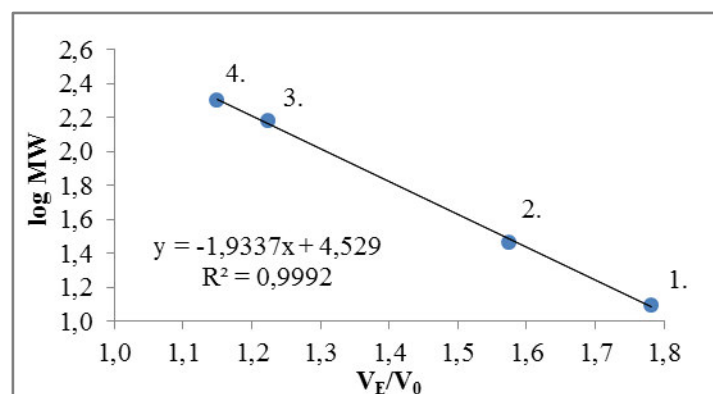


Abb. 2.1: Kalibriergerade der analytischen Gelfiltration. 1. Cytochrom C; 2. Carboanhydrase; 3. Alkoholdehydrogenase; 4. β -Amylase.

2.2.5 Messung der Enzymaktivität

2.2.5.1 Prinzip der Messung

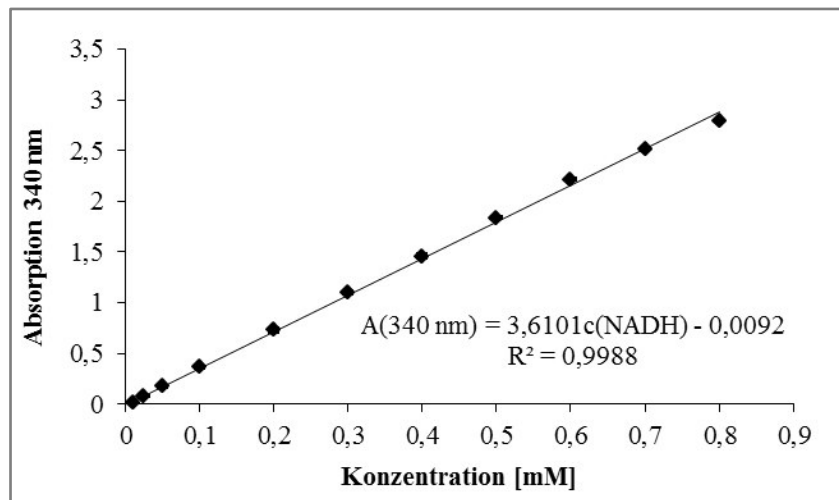
Die Enzymaktivität der Proteine sowie die Reaktionskinetiken wurden photometrisch über die Änderung der Cosubstratkonzentration gemessen. Die Messung beruht darauf, dass die SDR als Oxidoreduktasen bei der Reduktion von Ketonen die Cosubstrate NADPH und NADH zu NADP^+ und NAD^+ oxidieren und bei der Oxidation von Alkoholen NADP^+ und NAD^+ zu NADPH und NADH reduzieren. NADPH und NADH zeigen ein Absorptionsmaximum bei 259 und 340 nm. Im Vergleich dazu weisen NADP^+ und NAD^+ nur bei 259 nm ein Absorptionsmaximum auf. Über die lineare Abnahme bzw. die Zunahme der Absorption bei 340 nm über die Zeit kann so die katalytische Aktivität der SDR bestimmt werden. Die Kontrolle der Linearität erfolgt über den Regressionskoeffizienten (Norm: $R^2 \geq 0,98$) und die Auswertung

2 Material und Methoden

über die mittlere Absorptionsänderung pro Minute $\left(\frac{\Delta A}{\text{min}}\right)$. Wird die Aktivität mit dem Lambert-Beerschen Gesetz in Beziehung gesetzt, so ergibt sich Gleichung (1) für die Volumenaktivität. Dabei entspricht das Produkt aus $\varepsilon \cdot d$ der Steigung a einer Geradengleichung aus dem Verhältnis von Cosubstratkonzentration und Absorption. Aus diesem Grund wurden für die beiden Cosubstrate NADPH und NADH Kalibriergeraden (1-800 μM , 200 μl pro Karvität, 30 °C) erstellt. Durch das Ermitteln der Steigung und das Einsetzen in die Gleichung (1) konnte ein Faktor erhalten werden, mit dem die gemessene Absorptionsänderung pro Minute direkt in die Volumenaktivität [$\text{pkat/mL} = \text{pmol}/(\text{mL} \cdot \text{s})$] umgerechnet werden kann.

$$v = \frac{1}{\varepsilon \cdot d} \cdot \frac{\Delta A}{\text{min}} = \frac{1}{a} \cdot \frac{\Delta A}{\text{min}} = \frac{10^9 \text{ pmol}}{a \cdot 10^3 \text{ mL}} \cdot \frac{\Delta A}{60 \text{ s}} = \text{Faktor} \left[\frac{\text{pmol}}{(\text{mL} \cdot \text{s})} \right] \cdot \Delta A \quad (1)$$

$v = \text{Volumenaktivität}$, $\varepsilon = \text{Extinktionskoeffizient}$, $d = \text{Schichtdicke}$, $a = \text{Steigung der Geraden}$



$$v = \frac{10^9 \text{ pmol}}{3,6101 \cdot 10^3 \text{ mL}} \cdot \frac{\Delta A}{60 \text{ s}} = 4617 \left[\frac{\text{pmol}}{(\text{mL} \cdot \text{s})} \right] \cdot \Delta A$$

Abb. 2.2: Beispiel für die Kalibrierung mit NADH. Kalibrierung Infinite F200PRO, Dezember 2014.

Die Kalibrierung erfolgte für jede neue Stammlösung von NADPH und NADH (Beispiel Abb. 2.2). Der Faktor lag dabei immer zwischen 4500 und 4900. Für die Auswertung der Oxidationsreaktionen wurde ein fester Faktor von -4600 angenommen. Für die vollständige Auswertung wurde die Volumenaktivität mit der eingesetzten Enzymkonzentration [mg/mL] in die spezifische Aktivität [nkat/mg] umgerechnet.

2.2.5.2 Konzipierung der Messung

Für die photometrischen Messungen stand der Mikropplattenleser Infinite[®] F200PRO von Tecan (Software Magellan[™] 7, Tecan) mit einer automatischen Injektionsvorrichtung zur Verfügung. Verwendet wurden 96-Well Platten (Diagonal). Die Ansätze wurden so geplant, dass

2 Material und Methoden

jeweils 140 μL des Probenvolumens in die Karvitäten vorgelegt wurden (enthalten: Puffer, Enzym sowie Substrat oder Cosubstrat) und die Messung dann durch die automatische Zugabe von 60 μL Substrat oder Cosubstrat gestartet wurde. In Tabelle 2.13 sind der Ablauf und die Parameter der Messmethode aufgelistet. Die Messzeit variierte abhängig von der Aktivität des Proteins.

Tab. 2.13: Ablauf der Messmethode mit dem Mikroplattenleser Infinite® F200PRO (Magellan™ 7).

Schritt	Parameter
1. Injektion	$V_{\text{pro Well}} = 60 \mu\text{L}$, Geschwindigkeit 300 $\mu\text{L/s}$
2. Schütteln	$t = 20 \text{ s}$, Amplitude = 5 mm
3. Inkubieren	$t = 30 \text{ s}$, Kontrolle der Platte auf Luftblasen
4. Schütteln	$t = 30 \text{ s}$, Amplitude = 1 mm
5. Messung	$t_{\text{Messzeit}} = X \text{ min}$, Intervall = 20 s

Bei der Durchführung der Standardassays wurde in zwei Wiederholungen jede Probe (vier technische Replikate, $n = 4$) zusammen mit einer Referenz ohne Substrat (drei technische Replikate, $n = 3$) vermessen. Die Kinetiken wurden in vier Wiederholungen mit jeweils vier technischen Replikaten ($n = 4$) für die Referenz und die Proben durchgeführt. Die Referenzen enthielten entweder kein Cosubstrat oder kein Substrat.

2.2.5.3 Lösungen

Die Cosubstrate wurden in 10 mM wässrigen Stammlösungen angesetzt, bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert und für die Messungen entsprechend mit Wasser verdünnt. Da die beiden reduzierten Cosubstrate NADPH und NADH in Lösung über längere Zeit nicht stabil sind, wurden die Stammlösungen vor jeder Messung kontrolliert und die aktuellen Konzentrationen bestimmt. Die Konzentration der NADH- und NADPH-Lösungen wurde photometrisch bei 340 nm gegen Wasser vermessen (UVette®, Eppendorf). Über das Lambert-Beersche Gesetz konnte aus der erhaltenen Absorption die Konzentration ermittelt werden (Extinktionskoeffizient 6,22 [$1/(\text{mM} \cdot \text{cm})$]).

Die Stammlösungen und Verdünnungsreihen der Substrate für die Kinetikmessungen mit 3MCH und 3MCHol wurden als wässrige 100 mM Stammlösungen hergestellt und in den Assays entsprechend verdünnt. Die Substratlösungen der Diketone und der Hydroxyketone wurden als 100 mM methanolische Stammlösungen angesetzt und für die Assays so verdünnt, dass der Gehalt an Methanol im Assay bei 5% lag.

2 Material und Methoden

Der pH-Bereich von 4,5 bis 10,0 wurde mit vier verschiedenen Pufferlösungen abgedeckt (Tab. 2.14). Die Puffer wurden als 1 M-Stammlösungen hergestellt (Tab. 6.5, Anhang) und im Assay auf 100 mM verdünnt.

Tab. 2.14: Verwendete Assaypuffer und pH-Werte.

Puffer	pH-Werte
Citrat/Phosphat-Puffer (CPP)	4,5/5,0/5,5
Kaliumphosphatpuffer (KPP)	5,5/6,0/6,4/6,5/7,0/7,5
Tris/HCl-Puffer (THP)	7,5/8,0/8,5/9,0
Glycin/NaOH-Puffer (GNP)	9,0/9,5/10,0

2.2.5.4 Bestimmung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Substrat- und Cosubstratkonzentration

Die Messungen der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Substrat- und Cosubstratkonzentration wurden für das Enzym At2g29350(S26A,A48D) mit 5, 20, 50 und 100 µg/mL Protein und KPP pH 7,5 bei 30 °C über 6 min durchgeführt. Die 3MCH-Konzentration betrug 5 bzw. 10 mM und die NAD(P)H-Konzentration 0,2 bzw. 0,4 mM.

Die Messungen der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Substrat- und Cosubstratkonzentration wurden für die chimären Proteine CG1, CG2 und CG1(S27A,A49D,T109F) bei den jeweiligen pH-Optima der Enzyme durchgeführt (Tab. 3.7). Für CG1 betrug die Proteinkonzentrationen 10 µg/mL, für CG2 20 µg/mL und für CG1(S27A,A49D,T109F) 25 µg/mL. Die Messungen wurden bei 30 °C über 6 min durchgeführt. Für CG1 und CG2 wurde NADPH als Cosubstrat und für CG1(S27A,A49D,T109F) NADH eingesetzt. In Kombination wurden 3MCH-Konzentrationen von 1, 5 und 15 mM mit NAD(P)H-Konzentrationen von 0,2, 0,4 und 0,8 mM getestet.

2.2.5.5 Standardassays für die Aktivitätsmessungen

Unter Verwendung von vier Standardassays (Tab. 2.15) wurden die Wildtyp-Enzyme und Enzymvarianten auf ihre Aktivität, pH-Optima und Temperaturabhängigkeit getestet. Die Assays wurden standardmäßig bei einer Pufferkonzentration von 0,1 M im Assay und einer Temperatur von 30 °C durchgeführt. Die Enzymkonzentrationen lagen zwischen 1-50 µg/mL und die Messzeit zwischen 0-10 min. Die detaillierten Angaben der Enzymkonzentrationen und Messzeiten sind in den Tabellen 6.6-6.9 im Anhang aufgelistet.

2 Material und Methoden

Tab. 2.15: Substrat- und Cosubstratkonzentrationen der Standardassays für Reduktion und Oxidation.

TRL-Wildtyp-Enzyme, mit NADPH aktive TRL-Varianten und Chimären (modifiziert nach Reinhardt, 2014)	
Reduktion: - 5 mM 3MCH - 0,2 mM NAD(P)H	Oxidation: - 5 mM 3MCHol - 0,4 mM NAD(P) ⁺
mit NADH aktive TRL-Varianten (alle Varianten von At2g29350 mit der Mutation A48D und von At2g29360 mit der Mutation A49D)	
Reduktion: - 10 mM 3MCH - 0,4 mM NAD(P)H	Oxidation: - 10 mM 3MCHol - 0,6 mM NAD(P) ⁺
CoTR und CoTR(A206S)	
Reduktion: - 1 mM 3MCH - 0,2 mM NAD(P)H	Oxidation: - 2 mM 3MCHol - 0,2 mM oder 0,4 mM NAD(P) ⁺
CoTR-Varianten mit Mutationsstelle A49D	
Reduktion: - 1 mM und 5 mM 3MCH - 0,25 mM NAD(P)H	Oxidation: - 2 mM 3MCHol - 0,25 mM NAD(P) ⁺

2.2.5.6 Aktivitätsmessung der Enzymvarianten

Um die Enzymvarianten auf ihre Aktivität mit den Cosubstraten NAD(P)H zu testen, wurden sie in ihren jeweiligen Standardassays (Tab. 2.15) vermessen. Die Enzymvarianten von At2g29350 und At2g29360 wurden bei verschiedenen pH-Werten (CPP pH 5,0/KPP pH 6,0/ KPP pH 7,0) getestet. Die CoTR-Varianten wurden bei pH 6,0 (KPP) vermessen.

2.2.5.7 Ermittlung der pH- und der Temperaturabhängigkeit

Die Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert wurde unter den Bedingungen der Standardassays (Tab. 2.15) ermittelt. Für die Reduktion wurde ein pH-Bereich von pH 4,5 (CPP) bis 9,0 (THP) untersucht und für die Oxidation ein Bereich von pH 5,5 (KPP) bis 10,0 (GNP).

Für die Ermittlung der Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur wurde die spezifische Aktivität unter den jeweiligen Standardassaybedingungen (Tab. 2.15) gemessen. Die Messungen erfolgten bei den jeweiligen pH-Optima der Proteine (Abschnitt 3.1.4.1 und Tab. 3.7). Die Temperatur wurde über einen Bereich von 20 °C variiert (20, 25, 30, 35 und 40 °C).

2.2.5.8 Messung der Aktivität mit den Diketonen

Für die Messung der Aktivität mit den Diketonen wurde eine Substratkonzentration von 5 mM (Ausnahmen: At2g29350(S26A,A48D) und At2g29360(S27A,A49D) →10 mM) im Assay gewählt. Gemessen wurde bei den jeweiligen pH-Optima für die Reduktion (Abschnitt 3.1.4.1; At2g29330: pH 5,0 (CPP); Reinhardt, 2014). Für die Wildtyp-Enzyme wurde das ent-

2 Material und Methoden

sprechende Cosubstrat in einer Konzentration von 0,2 mM und für die Enzymvarianten in einer Konzentration von 0,4 mM eingesetzt. Die Enzymkonzentrationen lagen zwischen 5-20 µg/mL und die Messzeit zwischen 0-6 min. Detaillierte Angaben zu Enzymkonzentrationen und Messzeiten sind in Tabelle 6.10 im Anhang angegeben.

2.2.5.9 Ermittlung der enzymkinetischen Parameter

Für die Ermittlung der kinetischen Parameter anhand verschiedener Cosubstratkonzentrationen und konstanter Substratkonzentration wurden Cosubstratkonzentrationen zwischen 0,01-0,8 mM (bei NAD⁺ bis 3 mM) eingesetzt. Für die Ermittlung der kinetischen Parameter anhand verschiedener Substratkonzentrationen und konstanter Cosubstratkonzentration wurden Substratkonzentrationen zwischen 0,1-20 mM gewählt. Die Enzymkonzentrationen lagen zwischen 1-30 µg/mL und die Messzeit zwischen 0-10 min. Die Messungen erfolgten beim jeweiligen pH-Optimum der Proteine (Abschnitt 3.1.4.1). Detaillierte Angaben zu Enzymkonzentration und Messzeit sowie der verwendeten Substrat- und Cosubstratverdünnungen sind in Tabelle 6.11 im Anhang angegeben.

Die Auswertung erfolgte über die Auftragung der erhaltenen spezifischen Aktivitäten gegen die (Co-)Substratkonzentrationen und die Ermittlung der kinetischen Daten über lineare Regression mit dem Programm SigmaPlot 10 (Modul: Enzyme Kinetics 1.3) nach dem Modell von Michaelis und Menten (1913) oder entsprechend einer unkompetitiven Substratinhibition. Die Berechnung der optimalen Geschwindigkeit v_{opt} erfolgt unter Verwendung der folgenden Gleichung (Ziegler et al., 2009):

$$v_{opt} = \frac{V_{max}}{1 + 2\sqrt{\frac{K_m}{K_i}}}$$

V_{max} = Maximalgeschwindigkeit; v_{opt} = optimale Geschwindigkeit; K_m = Michaelis-Menten Konstante; K_i = Dissoziationskonstante des ESS-Komplexes; ESS = Enzym-Substrat-Substrat.

2.2.6 Stabilitätstest für NADH und NADPH

Um den Einfluss von Temperatur und pH-Wert auf die Cosubstrate zu untersuchen, wurden Stabilitätstests mit NADH und NADPH durchgeführt. Dafür wurden Kaliumphosphatpuffer (25 mM KPP, 125 mM NaCl, 1 mM DTT) mit den pH-Werten 5,5, 7,0 und 7,5 gewählt. Mit den Cosubstraten wurden in den drei Puffern ca. 2 mM-Lösungen hergestellt. Die 2 mM-Lösungen wurden dann zum einen 1:10 mit dem entsprechenden Puffer und zum anderen mit deionisiertem Wasser verdünnt. Von den erhaltenen Lösungen wurden photometrisch bei

2 Material und Methoden

340 nm die Absorptionen bestimmt und die genauen Konzentrationen über das Lambert-Beersche Gesetz ermittelt (Extinktionskoeffizient 6,22 [1/(mM · cm)]). Die Lösungen wurden anschließend aufgeteilt und zusammen mit den entsprechenden Puffern als Referenz bei 20 °C und 30 °C über 8 h inkubiert. Alle 2 h wurde die Konzentration bestimmt.

2.2.7 Chemische und biokatalytische Synthese der Referenzsubstanzen

2.2.7.1 Säulen- und Dünnschichtchromatographie (DC)

Säulenchromatographie wurde mit Kieselgel der Firmen ROTH und APPLICHEM (Kieselgel 60, 63-200 µm) bei leichtem Überdruck mit den angegebenen Lösungsmitteln (Abschnitt 2.2.7.4) durchgeführt.

Der Verlauf der Reaktionen, die Produktbildung und die säulenchromatographische Reinigung wurden mit qualitativer Dünnschichtchromatographie kontrolliert. Eingesetzt wurden kieselgelbeschichtete Aluminiumfolien (TLC Silica gel 60 F₂₅₄) der Firma MERCK. Der Nachweis der Substanzen erfolgte durch Fluoreszenzdetektion mittels UV-Licht der Wellenlänge $\lambda = 254$ nm. Für nicht UV-aktive Substanzen wurden die DC-Platten mit einem Kaliumpermanganat/Phosphorsäure-Tauchreagenz (Europäisches Arzneibuch, 7. Ausgabe, 2011) angefärbt und im Anschluss wärmebehandelt. Zur Charakterisierung der Verbindungen werden die R_F-Werte mit dem entsprechenden Laufmittel und der Detektionsmethode angegeben (Abschnitt 6.5, Anhang).

2.2.7.2 NMR-Spektroskopie und hochauflösende Massenspektrometrie (HRMS)

Die ¹H-NMR- und ¹³C-NMR-Spektren wurden mit den Geräten DD2 400 NMR und VNMRs 600 NMR von Agilent aufgenommen. Als Lösungsmittel wurde Deuteriochloroform verwendet. Die Kalibration erfolgte auf das durch den Restprotonengehalt des Lösungsmittels verursachte Signal (Gottlieb et al., 1997) und wird zusammen mit den experimentellen Daten der Substanzen angegeben (Abschnitt 6.5, Anhang). Die Angabe der chemischen Verschiebung δ erfolgt in ppm und die der Kopplungskonstanten J in Hertz (Hz). Für die Signale werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, dd = doppeltes Dublett, t = Triplet, dt = doppeltes Triplet, q = Quartett, m = Multiplett. Die Messungen wurden von Priv.-Doz. Dr. A. Porzel und R. Patzschke (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, Abteilung Wirk- und Naturstoffchemie) durchgeführt. Die Auswertung der Spektren erfolgte mit dem Programm MestReNova 8. Um die Zuordnung der Signale und die Strukturaufklärung zu erleichtern, wurden für die unbekanntes Verbindungen zusätzlich zu den entspre-

2 Material und Methoden

chend eindimensionalen Spektren zweidimensionale NMR-Spektren gemessen. HSQC-Spektren (Heteronuclear Single Quantum Coherence-Experiment) dienten dabei zur Zuordnung der Wasserstoffatome zu ihren entsprechenden Kohlenstoffatomen und COSY-Spektren (Correlated Spectroscopy-Experiment) für die Ermittlung benachbarter Wasserstoffatome.

Hochaufgelöste Massenspektren wurden mit einem Orbitrap Elite Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) ausgestattet mit einer HESI-Elektronenspray Ionenquelle (Spannung 4.0 kV, Säulentemperatur 275 °C, Source heater-Temperatur 40 °C, FTMS Auflösung 30.000) gemessen. Als Schutzgas diente Stickstoff. Die Probenauftragung erfolgte kontinuierlich mit einer 500 µL Hamilton Spritzenpumpe (Flussrate 5 µL/min). Die Kalibrierung des Geräts erfolgte extern mit einer Standardlösung (Pierce® LTQ Velos ESI positive ion calibration solution, Produktnummer 88323, Thermo Fisher Scientific). Die Datenauswertung wurde mit der Software Xcalibur software 2.7 SP1 durch die Mittelung von 25 scans durchgeführt. Es werden jeweils die berechneten und die gemessenen Massen angegeben. Die Messungen und die Auswertung (Abschnitt 6.5, Anhang) wurden von Dr. A. Frolov (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, Abteilung Wirk- und Naturstoffchemie) durchgeführt.

2.2.7.3 Festlegung der Nummerierung

Um eine Charakterisierung der Substanzen zu erleichtern, wurde für das Kohlenstoffgerüst der Diketone folgende Nummerierung unabhängig der IUPAC-Nomenklatur festgelegt. Die Wasserstoffatome werden entsprechend den benachbarten Kohlenstoffatomen beziffert.

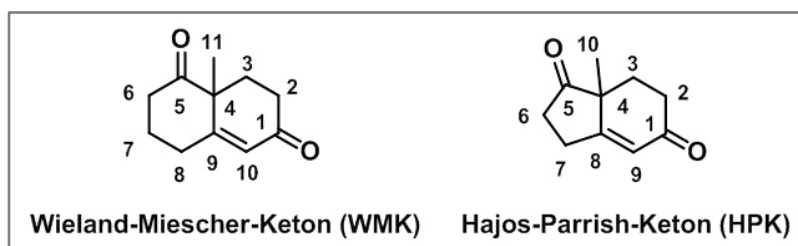


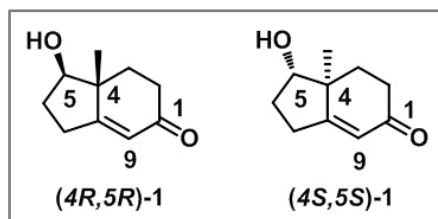
Abbildung 2.3: Festlegung der Nummerierung des Kohlenstoffgerüsts des Wieland-Mischer- und des Hajos-Parrish-Ketons.

2.2.7.4 Chemische Synthese der Referenzsubstanzen

Die Strukturaufklärung der hergestellten Referenzen erfolgte im Anschluss an jede Reaktion mittels NMR, HRMS und GCMS. Die erhaltenen analytischen Daten sind zusammen mit den R_f -Werten und den NMR- und EI-Spektren im Anhang (Abschnitt 6.5-6.6) angegeben.

2 Material und Methoden

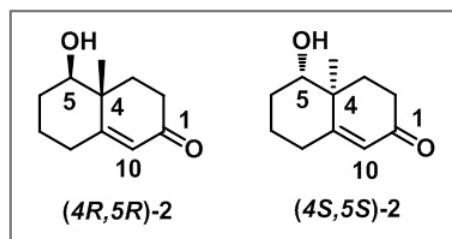
(1*R*,7*aR*)-1-Hydroxy-7*a*-methyl-2,3,7,7*a*-tetrahydro-1*H*-inden-5(6*H*)-on (*4R,5R*)-1 und
(1*S*,7*aS*)-1-Hydroxy-7*a*-methyl-2,3,7,7*a*-tetrahydro-1*H*-inden-5(6*H*)-on (*4S,5S*)-1



(*R*)-HPK (250 mg, 1,52 mmol, 1 Äq.) wurde in EtOH (6,5 mL) gelöst und die Lösung auf -10 °C bis -15 °C gekühlt. NaBH₄ (14,4 mg, 0,38 mmol, 0,25 Äq.) wurde langsam hinzugegeben und die Reaktion für 45 min bei -10 °C bis -15 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle, 100% EtOAc) wurde die Lösung mit 1M HCl behandelt (~ pH 6). Das Lösungsmittel wurde in *vacuo* entfernt und der Rückstand in Essigsäureethylester (10 mL) und Wasser (5 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (4x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Na₂CO₃- und NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel in *vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc, 2:1 → 1:1) lieferte Verbindung (*4R,5R*)-1 (228 mg, 1,37 mg, 90%) als beiges Öl.

Die Darstellung des Produkts (*4S,5S*)-1 ausgehend vom (*S*)-HPK erfolgte analog. Die Reaktion lieferte Verbindung (*4S,5S*)-1 (250 mg, 1,52 mmol, >99%) als beigen Feststoff.

(4*aR*,5*R*)-5-Hydroxy-4*a*-methyl-4,4*a*,5,6,7,8-hexahydronaphthalen-2(3*H*)-on (*4R,5R*)-2 und
(4*aS*,5*S*)-5-Hydroxy-4*a*-methyl-4,4*a*,5,6,7,8-hexahydronaphthalen-2(3*H*)-on (*4S,5S*)-2



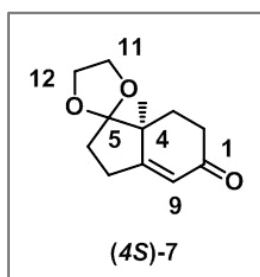
(*R*)-WMK (250 mg, 1,4 mmol, 1 Äq.) wurde in EtOH (9,5 mL) gelöst und die Lösung auf -10 °C bis -15 °C gekühlt. NaBH₄ (15,9 mg, 0,42 mmol, 0,3 Äq.) wurde langsam hinzugegeben und die Reaktion für 40 min bei -10 °C bis -15 °C gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle, 100% EtOAc) wurde die Lösung mit 1M HCl behandelt (~ pH 6). Das Lösungsmittel wurde in *vacuo* entfernt und der Rückstand in Essigsäureethylester (10 mL) und Wasser (5 mL) aufgenommen. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (4x) extra-

2 Material und Methoden

hiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Na_2CO_3 - und NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel in *vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc, 2:1 \rightarrow 1:1) lieferte ein Produktgemisch (insgesamt: 250 mg, 1,4 mmol, >99%) aus den Verbindungen (4*R*,5*R*)-2 (95%), (4*R*,5*S*)-2 (2%) und (1*R*,4*R*,5*R*)-6 (3%) als schwach bräunliches Öl.

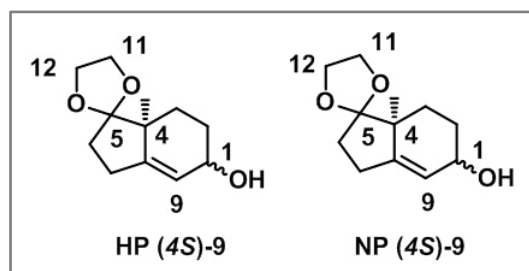
Die Darstellung des Produkts (4*S*,5*S*)-2 ausgehend vom (*S*)-WMK erfolgte analog. Die Reaktion lieferte ein Produktgemisch (insgesamt: 250 mg, 1,4 mmol, >99%) aus den Verbindungen (4*S*,5*S*)-2 (95%), (4*S*,5*R*)-2 (3%) und (1*S*,4*S*,5*S*)-6 (2%) als schwach bräunliches Öl.

(*S*)-7*a'*-Methyl-2',3',7',7*a'*-tetrahydrospiro[[1,3]dioxolan-2,1'-inden]-5'(6'H)-on (4*S*)-7



(*S*)-HPK (100 mg, 0,61 mmol, 1 Äq.) wurde in Ethylenglycol (6 mL) gelöst und 4 Å Molekularsieb hinzugefügt. *para*-Toluolsulfonsäure Monohydrat (116 mg, 0,61 mmol, 1 Äq.) wurde hinzugegeben und die Reaktion für 1,5 h bei RT gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle, 100% EtOAc) wurde der Reaktionsansatz auf ein Gemisch aus gesättigter Na_2CO_3 -Lösung und Eis geschüttet. Die wässrige Lösung wurde dann mit Essigsäureethylester (4x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen, über MgSO_4 getrocknet und das Lösungsmittel in *vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc, 2:1) lieferte die geschützte Verbindung (4*S*)-7 (127 mg, 0,61 mmol, >99%) als braunes Öl.

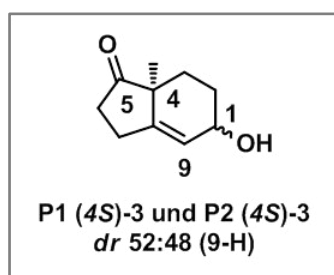
(5'*S*,7*a'**S*)-7*a'*-Methyl-2',3',5',6',7',7*a'*-hexahydrospiro[[1,3]dioxolan-2,1'-inden]-5'-ol und
(5'*R*,7*a'**S*)-7*a'*-Methyl-2',3',5',6',7',7*a'*-hexahydrospiro[[1,3]dioxolan-2,1'-inden]-5'-ol



2 Material und Methoden

LiAlH₄ (1,5 mL einer 1M Lösung in THF, 1,48 mmol, 3 Äq.) wurde in Et₂O (5 mL) gegeben und auf 0 °C gekühlt. Das geschützte Diketon (4*S*)-7 (103 mg, 0,49 mmol, 1 Äq.) wurde in Et₂O (1 mL) gelöst und vorsichtig zu der LiAlH₄-Lösung gegeben. Es wurde mit Et₂O (2x 1 mL) nachgespült. Die Reaktion wurde 1 h bei 0 °C gerührt und nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle, 100% EtOAc) durch die vorsichtige Zugabe von Wasser beendet. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (4x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Na₂CO₃- und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel in *vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc, 1,5:1) lieferte HP (4*S*)-9 (75 mg, 0,34 mmol, 72%) als gelbes Öl und ein Gemisch aus NP (4*S*)-9 mit HP (4*S*)-5 (26 mg, geringe Reinheit, siehe Abschnitt 3.3.3.2) als braunes Öl.

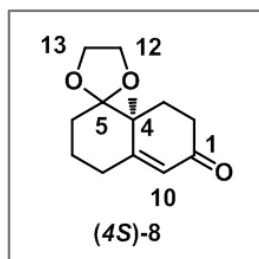
(5*S*,7*aS*)-5-Hydroxy-7*a*-methyl-2,3,5,6,7,7*a*-hexahydro-1*H*-inden-1-on und
(5*R*,7*aS*)-5-Hydroxy-7*a*-methyl-2,3,5,6,7,7*a*-hexahydro-1*H*-inden-1-on



Die geschützte Verbindung HP (4*S*)-9 (57 mg, 0,27 mmol, 1 Äq.) wurde in THF (3 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurde langsam 10% HCl (3 mL) hinzugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei 5 °C gerührt (Kühlraum). Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle, 100% EtOAc) wurde die Lösung mit Essigsäureethylester (3 mL) verdünnt und mit gesättigter Na₂CO₃-Lösung neutralisiert. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (4x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel in *vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc, 1,5:1) lieferte ein Produktgemisch (35 mg, 0,21 mmol, 79%) aus beiden Diastereomeren P1 (4*S*)-3 und P2 (4*S*)-3 (*dr* 52:48) als beiges Öl.

2 Material und Methoden

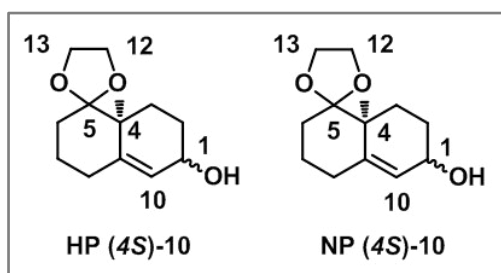
(*S*)-8a'-Methyl-3',4',8',8a'-tetrahydro-2H-spiro[[1,3]dioxolan-2,1'-naphthalen]-6'(7H)-on
(4*S*)-8



(*S*)-WMK (100 mg, 0,56 mmol, 1 Äq.) wurde in Ethylenglycol (6 mL) gelöst und 4 Å Molekularsieb hinzugefügt. *para*-Toluolsulfonsäure Monohydrat (107 mg, 0,56 mmol, 1 Äq.) wurde hinzugegeben und die Reaktion für 1 h bei RT gerührt. Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle, 100% EtOAc) wurde der Reaktionsansatz auf ein Gemisch aus gesättigter Na₂CO₃-Lösung und Eis geschüttet. Die wässrige Lösung wurde dann mit Essigsäureethylester (4x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel in *vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc, 2:1) lieferte die geschützte Verbindung (4*S*)-8 (124 mg, 0,56 mmol, >99%) als braunes Öl.

(6'*S*,8a'*S*)-8a'-Methyl-3',4',6',7',8',8a'-hexahydro-2H-spiro[[1,3]dioxolan-2,1'-naphthalen]-6'-ol
und

(6'*R*,8a'*S*)-8a'-Methyl-3',4',6',7',8',8a'-hexahydro-2H-spiro[[1,3]dioxolan-2,1'-naphthalen]-6'-ol

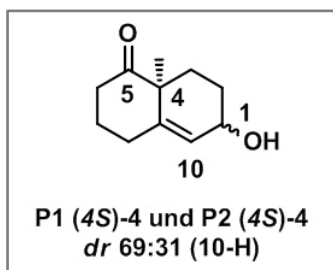


LiAlH₄ (1,4 mL einer 1M Lösung in THF, 1,39 mmol, 3 Äq.) wurde in Et₂O (5 mL) gegeben und auf 0 °C gekühlt. Das geschützte Diketon (4*S*)-8 (104 mg, 0,47 mmol, 1 Äq.) wurde in Et₂O (1 mL) gelöst und vorsichtig zu der LiAlH₄-Lösung gegeben. Es wurde mit Et₂O (2x 1 mL) nachgespült. Die Reaktion wurde 1 h bei 0 °C gerührt und nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle, 100% EtOAc) durch die vorsichtige Zugabe von Wasser beendet. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (4x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Na₂CO₃- und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel in *vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung

2 Material und Methoden

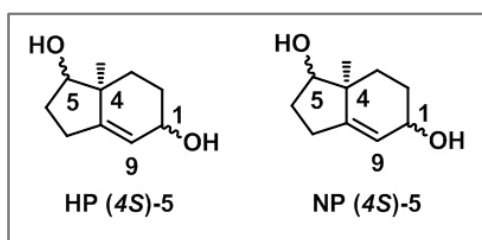
(PE:EtOAc, 1,5:1) lieferte HP (4*S*)-10 (69 mg, 0,31 mmol, 66%) als gelbes Öl und NP (4*S*)-10 (24 mg, geringe Reinheit, siehe Abschnitt 3.3.3.2) als braunes Öl.

(6*S*,8*aS*)-6-Hydroxy-8*a*-methyl-3,4,6,7,8,8*a*-hexahydronaphthalen-1(2*H*)-on und
(6*R*,8*aS*)-6-Hydroxy-8*a*-methyl-3,4,6,7,8,8*a*-hexahydronaphthalen-1(2*H*)-on



Das geschützte HP (4*S*)-10 (50 mg, 0,22 mmol, 1 Äq.) wurde in THF (3 mL) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Anschließend wurden langsam 10% HCl (3 mL) hinzugegeben. Die Reaktion wurde über Nacht bei 5 °C gerührt (Kühlraum). Nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle, 100% EtOAc) wurde die Lösung mit Essigsäureethylester (3 mL) verdünnt und mit gesättigter Na₂CO₃-Lösung neutralisiert. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (4x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel in *vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc, 1:1,5) lieferte ein Produktgemisch (26 mg, 0,14 mmol, 65%) aus beiden Diastereomeren P1 (4*S*)-4 und P2 (4*S*)-4 (*dr* 69:31) als braunes Öl.

(7*aS*)-7*a*-methyl-2,3,5,6,7,7*a*-hexahydro-1*H*-indene-1,5-diol

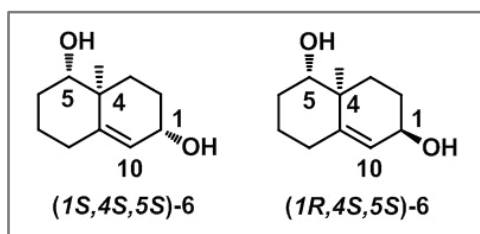


LiAlH₄ (1,83 mL einer 1M Lösung in THF, 1,8 mmol, 4 Äq.) wurde zu Et₂O (10 mL) gegeben und auf 0 °C gekühlt. (*S*)-HPK (75 mg, 0,45 mmol, 1 Äq.) wurde in Et₂O (2 mL) gelöst und langsam zu der LiAlH₄-Lösung gegeben. Es wurde mit Et₂O (2x 1 mL) nachgespült. Die Reaktion wurde 2 h bei RT gerührt und nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle, 100% EtOAc) durch die vorsichtige Zugabe von Wasser bei 0 °C beendet. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (4x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Na₂CO₃- und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das

2 Material und Methoden

Lösungsmittel in *vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc, 2:1 → PE:EtOAc, 1:1) lieferte HP (4*S*)-5 (67 mg, 0,39 mmol, 87%) als braunes Öl und NP (4*S*)-5 (8 mg, geringe Reinheit, siehe Abschnitt 3.3.3.2) als braunen Feststoff.

(1*S*,6*S*,8*aS*)-8a-Methyl-1,2,3,4,6,7,8,8a-octahydronaphthalene-1,6-diol (1*S*,5*S*,6*S*)-6 und (1*S*,6*R*,8*aS*)-8a-Methyl-1,2,3,4,6,7,8,8a-octahydronaphthalene-1,6-diol (1*R*,4*S*,5*S*)-6



LiAlH₄ (1,12 mL einer 1M Lösung in THF, 1,12 mmol, 4 Äq.) wurde zu Et₂O (8 mL) gegeben und auf 0 °C gekühlt. (*S*)-WMK (50 mg, 0,28 mmol, 1 Äq.) wurde in Et₂O (0,5 mL) gelöst und langsam zu der LiAlH₄-Lösung gegeben. Es wurde mit Et₂O (2x 0,5 mL) nachgespült. Die Reaktion wurde 2 h bei RT gerührt und nach vollständigem Umsatz (DC-Kontrolle, 100% EtOAc) durch die vorsichtige Zugabe von Wasser bei 0 °C beendet. Die wässrige Phase wurde mit Essigsäureethylester (4x) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit gesättigter Na₂CO₃- und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über MgSO₄ getrocknet und das Lösungsmittel in *vacuo* entfernt. Säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc, 1,5:1 → PE:EtOAc, 1:1) lieferte Verbindung (1*S*,5*S*,6*S*)-6 (43 mg, 0,23 mmol, 84%) als beigen Feststoff und Verbindung (1*R*,4*S*,5*S*)-6 (19 mg, geringe Reinheit, siehe Abschnitt 3.3.3.2) als gelbes Öl.

2.2.7.5 Biokatalytische Synthese der α,β -ungesättigten Hydroxyketone

Zur Herstellung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone wurden die als Substrate von At2g29350 und CoTR akzeptierten Enantiomere von WMK und HPK in 20 mg-Ansätzen mit den beiden Enzymen umgesetzt. Die Ansätze von At2g29350 wurden bei pH 5,5 (KPP) mit NADPH und die von CoTR bei pH 5,0 (CPP) mit NADH durchgeführt. Die Ansätze der beiden Enzyme sind mit den genauen Angaben in Tabelle 2.16 aufgeführt.

Allgemeine Durchführung:

NAD(P)H (1,4 Äq.) wurde in entionisiertem Wasser (Gesamtvolumen der Ansätze: 11 mL) gelöst und der entsprechende Puffer hinzugegeben (1,1 mL, 1 M SL → 0,1 M im Ansatz). Anschließend wurde das entsprechende enantiomerenreine Substrat (V_{SL}, 200 mM methano-

2 Material und Methoden

liche Stammlösung (SL), 1,0 Äq) hinzugegeben. Das jeweilige Protein (At2g29350 → 75 µg/mL, CoTR → 250 µg/mL) wurde hinzugefügt und der Ansatz steril filtriert (Puradisc FP 30/0,2 CA-S, Whatman) und bei 30 °C über 17-20 h unter leichtem Schwenken inkubiert. Bei einem fast vollständigen Umsatz (DC-Kontrolle, 100% EtOAc) des Substrats*, wurde die Reaktion durch Zugabe von gesättigter Na₂CO₃-Lösung (2 mL) beendet. Der Ansatz wurde mit Essigsäureethylester (4x) extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über MgSO₄ getrocknet. Das Lösungsmittel wurden *in vacuo* entfernt und die säulenchromatographische Reinigung (PE:EtOAc 2:1 → PE:EtOAc 1:1) lieferte die Produkte als gelbliche bis bräunliche Öle. Die erhaltenen Produkte wurden mittels NMR und GCMS vermessen (Abschnitte 3.3.3.3 und 6.5-6.6, Anhang).

*Konnte nach einem Tag kein fast vollständiger Umsatz festgestellt werden, so wurde weiteres NAD(P)H (1,4 Äq.) und weiteres Protein hinzugefügt, der Ansatz erneut steril filtriert und die Reaktion für weitere 17-20 h inkubiert.

Tab. 2.16: Biokatalytische Umsetzungen des Wieland-Miescher- und des Hajos-Parrish-Ketons mit At2g29350 (a) und CoTR (b).

a) Ansatz/Substrate (20 mg)	Cosubstrat (NADPH)			Enzym c [µg/mL]	Zeit [d]
	V _{SL} [mL]	n [mmol]	Äq.		
(S)-WMK	0,57	0,11	1,0	75	1
(S)-HPK	0,61	0,12	1,0	75	1
(R)-HPK	0,61	0,12	1,0	2x 75*	2x 1*

b) Ansatz/Substrate (20 mg)	Cosubstrat (NADH)			Enzym c [µg/mL]	Zeit [d]
	V _{SL} [mL]	n [mmol]	Äq.		
(R)-WMK	0,57	0,11	1,0	250	1
(S)-WMK	0,57	0,11	1,0	2x 250*	2x 1*
(R)-HPK	0,61	0,12	1,0	250	1

2.2.8 GCMS-Analytik der biokatalytischen Produktbildung

Die Produktbildung der enzymatischen Umsetzungen wurde mittels GCMS analysiert. Dazu stand der Gaschromatograph GC-2010 gekoppelt mit dem Massenspektrometer GCMS-QP2010S (Shimadzu) und eine DB5 Säule (FS-Supreme-5ms, 30 m x 0,25 mm, Filmdicke 0,1 µm, CS-Chromatografie Service) zur Verfügung. Als Trägergas wurde Helium mit einer konstanten Flussrate von 1 ml/min verwendet. Von jeder Probe wurde ein Volumen von 1 µl splitlos injiziert. Es wurde bei einer Detektorspannung von 1,5 kV absolut und einer Interface-Temperatur von 250 °C gearbeitet. Die Quelle wurde bei einer Temperatur von 200 °C (Injek-

2 Material und Methoden

tortemperatur) betrieben. Die verwendeten GC-Temperatur- und MS-Analyseprogramme sind in Tabelle 2.17 zusammengefasst.

Tab. 2.17: GC-Temperaturgradienten und MS-Analysemethoden.

Substanzen	GC-Temperaturgradient				MS-Analyse	
1. 3MCH/ 3MCHol	50 °C (0 min)	3 °C/min	65 °C (3 min)	35 °C/min	250 °C (1 min)	4,0-14 min, Scan-Modus (Totalionenstrom), 50-400 m/z
2. (S)/(R)-WMK und reduzierte Derivate	60 °C (0 min)	10 °C/min	130 °C (10 min)	5 °C/min	200 °C (1 min)	3,0 -31,5 min, Scan-Modus (Totalionenstrom), 50-400 m/z
3. (S)/(R)-HPK und reduzierte Derivate	60 °C (1 min)	2 °C/min	100 °C (17,5 min)	10 °C/min	200 °C (1 min)	5,0 -48,5 min, Scan-Modus (Totalionenstrom), 50-400 m/z

2.2.8.1 Qualitativer Produktnachweis

Der qualitative Produktnachweis erfolgte für alle Analyten. Dafür wurden sowohl die käuflichen Substanzen (3MCH, 3MCHol, (S)/(R)-WMK, (S)/(R)-HPK), als auch die synthetisch hergestellten Hydroxyketon- und Diol-Referenzen mit einer Konzentration von ca. 1,25 mM (Ausnahme: Diketone → 0,125 mM) in das Gerät injiziert und die Retentionszeiten und Massenfragmentierungsmuster (Abschnitt 6.5-6.6, Anhang) ermittelt. Als Lösungsmittel wurden Essigsäureethylester (Diketone und Derivate) und Hexan (3MCH/3MCHol) verwendet. Als Detektionslimits (limit of detection, LOD) wurde ein Signal:Rausch-Verhältnis von 1:2-3 festgelegt. Für den qualitativen Nachweis der Produktbildung bei der Umsetzung von 3MCH (Reduktion) und 3MCHol (Oxidation) durch die Enzymvarianten und Chimären wurde pro Protein eine Probe und eine Negativkontrolle (Protein 10 min/95 °C inkubiert) angesetzt, die jeweils einmal vermessen wurden. Der qualitative Produktnachweis der Umsetzung der Diketone (Reduktion) und Hydroxyketone (Oxidation) mit den Wildtyp-Enzymen, Enzymvarianten und Chimären erfolgte in Verbindung mit den semiquantitativen Messungen.

2.2.8.2 Semiquantitativer Produktnachweis

Die Semiquantifizierung erfolgte für die Diketone und die erhaltenen Reduktionsprodukte durch Integration der Peakflächen. Das Quantifizierungslimit (limit of quantification, LOQ) wurde empirisch ermittelt und mit einem Signal:Rausch-Verhältnis von >5, einer Peakfläche von ≥40.000 und einer maximalen prozentualen Standardabweichung von ≥12% festgelegt. Für den qualitativen und semiquantitativen Produktnachweis der Umsetzung der Diketone

2 Material und Methoden

(Reduktion) und Hydroxyketone (Oxidation) mit den Wildtyp-Enzymen, Enzymvarianten und Chimären wurden jeweils drei Wiederholungen sowie eine Negativkontrolle (Protein 10 min/95 °C inkubiert) pro Substrat angesetzt. Jede Wiederholung sowie die Negativkontrolle wurde 3x vermessen (technische Replikate: n = 3).

2.2.8.3 biokatalytische Ansätze und Vermessung der Proben

Das Gesamtvolumen pro Ansatz betrug 0,5 mL. Die Ansätze wurden auf Eis vorpipettiert und enthielten 1 mM Substrat (3MCH oder 3MCHol als 20 mM wässrige Stammlösung bzw. (S)/(R)-WMK, (S)/(R)-HWK, (4S,5S)-1, (4R,5R)-1, (4S,5S)-2 oder (4R,5R)-2 als 20 mM methanolische Stammlösung) und 3 mM Cosubstrat (NAD(P)(H) als 10 mM wässrige Stammlösungen). Die Ansatzpuffer (100 mM) wurden entsprechend den pH-Optima der Enzyme gewählt (Abschnitt 3.1.4.1 und Tab. 3.7; Ausnahmen: At2g29360(S27A,A49D) und At2g29350(V103A)). Zum Abschluss wurden die Enzyme entsprechend ihrer Aktivität (75 oder 150 µg/mL) hinzugefügt. Die genauen Angaben für jedes Protein sind in den Tabellen 6.12 und 6.13 im Anhang aufgelistet. Die Ansätze wurden dann bei 30 °C und 350 rpm für 1 h (3MCH/3MCHol) bzw. 3 h (Diketone/Hydroxyketone) inkubiert. Durch die Zugabe von 150 µL gesättigter Na₂CO₃-Lösung wurden die Reaktionen gestoppt und mit 250 µL Hexan (3MCH/3MCHol) bzw. Essigsäureethylester (Diketone/Hydroxyketone) extrahiert. Anschließend wurden die Ansätze bei RT und 13.000 rpm für 1-2 min zentrifugiert.

Die Hexanphasen der 3MCH/3MCHol-Ansätze wurden abgenommen und direkt in das Gerät injiziert. Die Auswertung erfolgte über den Vergleich mit den ermittelten Retentionszeiten und Massenfragmentierungsmustern.

Von den Essigsäureethylesterphasen der Diketon/Hydroxyketon-Ansätze wurden 90 µL als Probe abgenommen und mit 10 µL einer 1 mg/mL (+)-Campher-Lösung (Referenz für Injektorkontrolle) versetzt. Die qualitative Auswertung erfolgte über den Vergleich mit den ermittelten Retentionszeiten und Massenfragmentierungsmustern und die semiquantitative Auswertung manuell über die Peakflächen.

2.2.9 Kristallisation

2.2.9.1 Screening von Kristallisationsbedingungen im 96-Well-Maßstab

Um geeignete Bedingungen für das Kristallisieren der Enzyme At2g29350 und CoTR zu finden, wurden zuerst verschiedene Kristallisationsbedingungen im 96-Well-Maßstab (3-well

2 Material und Methoden

Kristallisationsplatten, SWISSCI) gescreent. Für beide Enzyme wurde das Screening mit je fünf verschiedenen Präparationsansätzen durchgeführt (Tab. 2.18a und b).

Tab. 2.18: Präparationsansätze für das 96-Well-Screening von CoTR (a) und At2g29350 (b).

a)	Substrat	c[mM]	c(NADP ⁺) [mM]	Lagerpuffer
1.	-	-	-	Tris/HCl
2.	(<i>R</i>)-WMK	0,58	0,58	Tris/HCl
3.	Tropinon	0,58	0,58	Tris/HCl
4.	1,4-Cyclohexadion	0,58	0,58	Tris/HCl
5.	(-)-Carvon	0,58	0,58	Tris/HCl

b)	Substrat	c[mM]	c(NADP ⁺) [mM]	Lagerpuffer
1.	-	-	-	HEPES
2.	(<i>S</i>)-HPK	0,60	0,60	HEPES
3.	(<i>S</i>)-WMK	0,60	0,60	Tris/HCl
4.	(-)-Menthon	0,60	0,60	Tris/HCl
5.	(-)-Carvon	0,60	0,60	Tris/HCl

Für CoTR wurden alle Ansätze (1.-5.) in einem Tris-Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 1mM DTT) angesetzt. Für At2g29350 wurden die ersten zwei Ansätze (1.-2.) in einem HEPES-Puffer (20 mM HEPES pH 8,0, 1mM DTT) und die letzten drei Ansätze (3.-5.) in dem Tris-Puffer entsprechen CoTR durchgeführt. Die Enzyme wurden nach dem Überführen in die jeweiligen Puffer auf eine Proteinkonzentration von 15 mg/mL aufkonzentriert. Neben den Ansätzen zum Kristallisieren der Apoformen (Tab. 2.18a und b, 1.) wurden auch verschiedene Ansätze mit Cosubstrat und verschiedenen Substraten für das Cokristallisieren des inaktiven Komplexes (Tab. 2.18a und b, 2.-5.) angesetzt. Für das Cokristallisieren wurde ein 1,2 molarer Überschuß an Substrat und Cosubstrat im Vergleich zum jeweiligen Enzym eingesetzt (CoTR: 0,58 mM; At2g29350: 0,60 mM). Das Screening mit den 96-Well-Platten verlief über die auf Dampfdiffusion basierende Sitting drop-Methode. In die Reservoirkammer wurden 55 µL der Kristallisationslösung vorgelegt. Danach wurden in die drei umliegenden Karvitäten von einem Pipettierroboter (Cartesian Microsys, Zinsser-Analytik) 250 nL der Lösung aus der Reservoirkammer mit 250 nL des Proteinansatzes vereint. Die Platten wurden mit UV-durchlässiger Folie luftdicht verschlossen. Sowohl das Pipettieren als auch das Lagern der Platten erfolgte im Kühlraum bei 15 °C. Für das 96-Well-Screening wurden kommerziell erhältliche Kits mit verschiedenen Kristallisationsbedingungen verwendet (Tab. 2.19). Die fertigen Kristallisationsplatten wurden in ein automatisiertes Imaging-System (Desktop

2 Material und Methoden

Minstrel™ UV, Rigaku Europe) gestellt und dort über einen Zeitraum von 4-5 Wochen in regelmäßigen Abständen fotografiert.

Tab. 2.19: Screeningkits für das 96-Well-Screening.

Jena Bioscience	Hampton research	Sigma	Molecular Dimension
JBS classic 1-10	HR crystal screen	Sigma low ionic	MD Morpheus
JBScreen JCSG++ 1-4 (HTC)	HR crystal Screen 2		
JBS cryo HTC	HR Slice pH		

2.2.9.2 Fine screening der Kristallisationsbedingungen

Anhand der Ergebnisse aus den 96-Well Screenings wurden verschiedene Kristallisationsbedingungen im 15-Well-Maßstab (EasyXtal-Platten, Qiagen) im Hanging drop-Verfahren für CoTR getestet. Für dieses fine screening wurden zum einen die Enzymkonzentration (5-15 mg/mL) und zum anderen bei gepufferten Bedingungen der pH-Wert (\pm pH 0,1 bis \pm pH 0,5) variiert. NADP⁺ und die Substrate wurden entsprechend Tabelle 2.18a weiterhin in einem 1,2-fachen molaren Überschuss eingesetzt. Einige Bedingungen wurden sowohl bei 15 °C als auch bei RT getestet. Eine genaue Übersicht über die getesteten Bedingungen des fine screenings ist in Tabelle 6.14 im Anhang dargestellt. In die Reservoirkammern der 15-Well Platten wurden je 0,5 mL der Kristallisationslösung vorgelegt. Für die 1:1-Ansätze wurden je 2 μ L Proteinlösung und 2 μ L der Kristallisationslösung vereint. Die Platten wurden bei der entsprechenden Temperatur gelagert und in regelmäßigen Abständen lichtmikroskopisch unter polarisiertem Licht auf Kristallbildung und -wachstum kontrolliert.

2.2.9.3 Kryoschutz und Liganden-Soaking

Zum Schutz der CoTR-Kristalle während der Analyse mittels Röntgenstrahlung wurden die Kristalle schockgefroren. Damit sich dabei keine Eiskristalle bilden, welche die Datensammlung stören würden, wurden die Proteinkristalle zuvor mit einem Kryoschutz versehen. Dazu wurden 20-40% Ethylenglycol zu den Kristallisationsbedingungen gegeben und der entsprechende Kristall unter Zuhilfenahme einer Nylonschlinge (Loop) kurz in die Lösung getaucht und dann direkt auf den Goniometerkopf gesetzt und in einem Stickstoffstrom bei -180°C (Rigaku XSTREAM 2000) tiefgefroren. Um eine zusätzliche Aufnahme von Substrat zu ermöglichen wurden die entsprechenden Kryolösungen teilweise mit den gewünschten Substraten und Cosubstraten versetzt und die Kristalle 1-5 min in der Lösung inkubiert (Soaking).

2.2.9.4 Datensammlung- und prozessierung

Die Datensammlung- und prozessierung wurden von Dr. C. Parthier (MLU, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Physikalische Biotechnologie) durchgeführt. Die Aufnahme der Beugungsdatensätze der CoTR-Kristalle erfolgte an einem Röntgendrehanodengenerator (MicroMaxTM 007, Rigaku, $\lambda = 1.54182 \text{ \AA}$) mit einem Saturn 944+ CCD Detektor bzw. einer R-axis IV++ Imaging Plate (Rigaku). Der Datensatz des CoTR-Kristalls b wurde zudem am Synchrotron BESSY-II (Helmholtz-Institut, Berlin) an der Beamline 14.1 ($\lambda = 0,9184 \text{ \AA}$) mit einem PILATUS-6M-Detektor (Dectrisq) erhalten. Die Prozessierung der Datensätze erfolgte mit dem Programm XDS (Kabsch, 2010). Die Statistik der Datensammlung ist in Tabelle 6.19 im Anhang aufgeführt.

2.2.9.5 Strukturlösung und Verfeinerung

Die Strukturlösung und Verfeinerung wurden von Dr. C. Parthier (MLU, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Physikalische Biotechnologie) durchgeführt. Die Phasierung der Datensätze erfolgte durch die Methode des molekularen Ersatzes (Molecular Replacement) mittels des Programms PHASER des CCP4-Softwarepaketes (McCoy et al., 2007). Als Template wurde die Kristallstruktur der Tropinonreduktase I aus *D. stramonium* (PDB-Code: 1AE1; Nakajima et al., 1998) verwendet (Sequenzidentität zu CoTR: 51%). Die Kristallstrukturen wurden mit den Programmen COOT (Emsley et al., 2010) und phenix.refine (Adams et al., 2010) gebaut und verfeinert. Die Strukturvalidierung erfolgt mit der MOLPROBITY-Software (Chen et al., 2010). Die Statistik der Strukturverfeinerung ist in Tabelle 6.19 im Anhang wiedergegeben.

Die Strukturanalyse und graphische Darstellung der Kristallstrukturen erfolgte mit dem Programm Pymol (v0.99, DeLano Scientific LLC). Die Interaktionsflächen wurden mit dem Tool PDBePISA (EMBL-EBI, www.ebi.ac.uk/pdbe/pisa/) analysiert.

2.2.10 Methoden der Bioinformatik

Da es nicht möglich war CoTR zusätzlich zum NADP⁺ mit einem der Diketone cozukristallisieren, wurden die Diketone in die Kristallstruktur gedockt. Das Docking erfolgte unter der Anleitung von Priv.-Doz. Dr. W. Brandt (Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, Abteilung Wirk- und Naturstoffchemie). Das Docking wurde zum einen mit dem Programm MOE (Version 2014.9, Chemical Computing Group Inc.) und zum anderen mit dem Pro-

2 Material und Methoden

gramm GOLD (GOLD suite, Version 5.2.2) durchgeführt. Für das Docking wurde die Kristallstruktur B von CoTR verwendet (Auflösung 1,44 Å).

2.2.10.1 Konformationsberechnungen der Diketone

Durch ihre beiden annilierten Ringsysteme können die bityklischen Diketone in verschiedenen Konformationen vorliegen. Da während Dockingstudien Ringsysteme nicht ihre Ringkonformationen ändern können, wurde vor dem Docking für die vier Enantiomere der beiden Diketone eine Konformationssuche durchgeführt. Hierfür wurden LowMod Moleküldynamik Simulationen in MOE mit dem Kraftfeld MMFF94 (Halgren, 1996) durchgeführt. Für das Docking wurde das jeweils energetisch niedrigste Konformer genutzt.

2.2.10.2 Docking mit MOE

Das Docking unter Verwendung des Programms MOE beruht auf dem direkten Docking der Liganden in die, durch die Kristallstruktur vorgegebene, starre Struktur der Substratbindetasche. Vor dem Docking wurden die Wasserstoffatome in der Kristallstruktur ergänzt. Für das Docking wurde das Tetramer verwendet, jedoch wurde nur die Substratbindetasche der Kette A angewählt und zuvor NADP⁺ manuell in NADPH geändert. Da die Kette A zwei mögliche Konformationen für die Aminosäure V156 enthielt, wurde die Konformation ausgewählt, welche in den Ketten B-D vorlag. Das verwendete Kraftfeld war Amber 10:EHT (Cornell et al., 1995), für eine zusätzliche Energieminimierung wurde das induced fit-Tool angewählt und als Scoring-Funktion wurde der London ΔG score verwendet. Die Auswertung der Docking-Ergebnisse erfolgte im Vergleich zu der, über die GCMS-Ergebnisse erhaltene Produktbildung und unter Berücksichtigung der „Energie refine“-Werte.

2.2.10.3 Docking mit GOLD

Das Docking mit dem Programm GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking, Cambridge Crystallographic Data Centre, Jones et al., 1997; Verdonck et al., 2003) erlaubt das Docken der Liganden in die Substratbindetasche der Kristallstruktur unter Einbeziehung von flexiblen Seitenketten. Vor dem Docking wurden aus der Kristallstruktur alle weiteren Liganden (H₂O, Dioxan und Ethylenglycol) mit Ausnahme von NADP⁺ entfernt und die Kette A als Monomer gespeichert. Die Wasserstoffatome wurden hinzugefügt und NADP⁺ wurde manuell in NADPH geändert. Die Konformation von V156 wurde entsprechend dem Docking mit MOE ausgewählt. Ausgehend vom Wasserstoffatom der Hydroxygruppe von Y168 wurde die Substratbindetasche in einem Radius von 15 Å markiert und die Seitenketten der Amino-

2 Material und Methoden

säuren L205, F200, Y209 und F210 als flexibel definiert. Dadurch werden während der Berechnung alle möglichen Rotamere der vier Aminosäuren berücksichtigt. Für jedes Enantiomer wurden unter Verwendung des GOLDScores die besten 30 Dockingposen ermittelt. Die Auswertung der Dockingposen erfolgte im Vergleich zu der über die GCMS-Analyse erhaltene Produktbildung zusammen mit der Ermittlung des Abstands der Hydridübertragung und der Wasserstoffbrückenbindungen zur katalytischen Tetrade. Passende Dockingergebnisse wurden anschließend mittels Energieminimierung (MOE, Kraftfeld: Amber 99; Cheatham et al., 1999) optimiert.

3 Ergebnisse

3.1 Optimierung der Cosubstratpräferenz der Tropinonreduktase-ähnlichen Enzyme aus *A. thaliana* und von CoTR aus *C. officinalis* durch gerichtete Mutagenese

3.1.1. Änderung der Cosubstratpräferenz von At2g29350

Durch ihre strikte Aktivität mit NADPH gegenüber CoTR mit einer Aktivität sowohl mit NADPH als auch mit NADH wurde At2g29350 als Startpunkt für die Optimierung der Cosubstratpräferenz ausgewählt. At2g29330 bot sich auf Grund ihrer NADH-Abhängigkeit und einer Sequenzidentität von 64% als Leitstruktur zur Optimierung der Cosubstratspezifität von At2g29350 an. Dazu wurden die Homologiemodelle von At2g29350 mit NADPH und At2g29330 mit NADH aufeinandergelegt (Abb. 3.1; Fischer 2015; vergl. Abb. 6.12a und b, Anhang) und die beiden relevanten Bereiche (Glycin-reiches Motiv und Ende des zweiten β -Faltblattes (β B)) verglichen.

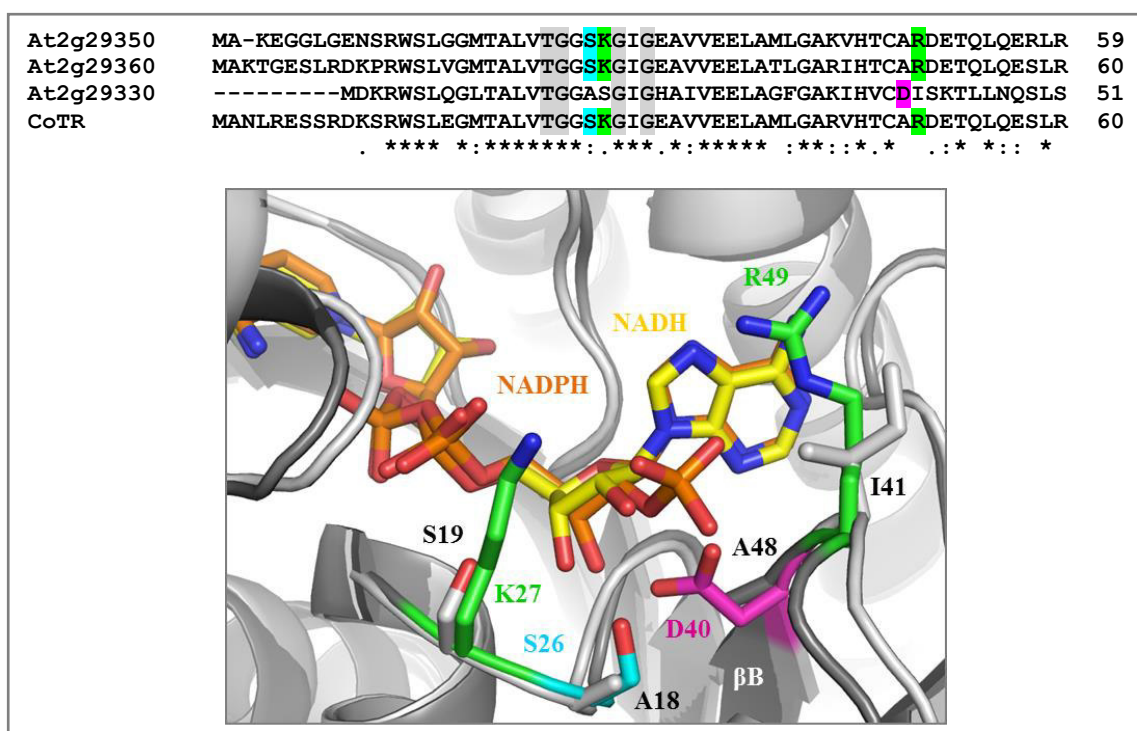


Abb. 3.1: Sequenz- und Strukturalignment der Cosubstratbinderegionen von At2g29350 und At2g29330. Zusätzlich N-terminale Sequenzen von At2g29360 und CoTR. Dunkelgrau: At2g29350; hellgrau: At2g29330; orange: NADPH; gelb: NADH. Relevante Aminosäuren werden als Sticks und für die Übersichtlichkeit ohne Hauptkette dargestellt; pink: saure Aminosäure am Ende des zweiten β -Faltblattes (β B) von At2g29330; hellblau: Serin im Glycin-reichen Motiv von At2g29350; grün: basische Aminosäuren von At2g29350 im Glycin-reichen Motiv und nach dem zweiten β -Faltblatt (β B). Im Alignment grau: Glycin-reiches Motiv. Homologiemodelle, Fischer, 2015.

3 Ergebnisse

Im Fall von At2g29330, welche eine Aktivität mit NAD(H) und NADP(H) aufweist, jedoch eine 5x höhere Affinität zu NADH als zu NADPH zeigt (Reinhardt, 2014), findet sich am Ende des zweiten β -Faltblattes (β B) der erwartete negativ geladene bzw. saure Rest (D40). Das Aspartat ist gewöhnlich so orientiert, dass es zu beiden Hydroxygruppen der Adenosinribose Wasserstoffbrückenbindungen ausbilden kann und somit NADH im aktiven Zentrum bindet und positioniert. Liegt das Aspartat im Enzym vor, wird NADPH meist gar nicht oder nur mit verminderter Affinität gebunden, da es zwischen der Phosphat-Gruppe an der Adenosinribose und der Seitenkette des Aspartats zu elektrostatischer Abstoßung und/oder sterischer Hinderung kommt. Bei dem mit NADP(H) aktiven Enzym At2g29350 bestimmen hingegen zwei basische Aminosäuren die Cosubstratspezifität. Eine der basischen Aminosäuren ist in dem Glycin-reichen Motiv (K27) positioniert. Die zweite Aminosäure hingegen sitzt unmittelbar hinter dem zweiten β -Faltblatt (β B, R49). Die basischen Aminosäuren sind in der Lage Wasserstoffbrückenbindungen zu der Phosphat-Gruppe an der Adenosinribose auszubilden und helfen so das Cosubstrat zu positionieren und zu binden.

Ausgehend von dem Sequenz- und Strukturvergleich wurde zunächst mit ortsgerichteter Mutagenese-PCR (Abschnitt 2.2.3.1) in At2g29350 ein Aspartat am Ende des zweiten β -Faltblattes eingeführt (A48D). Zudem sollte eine potenzielle Bindung zur Phosphatgruppe von NADPH reduziert werden, indem K27 entsprechend At2g29330 gegen ein Serin ausgetauscht wurde (Abb. 3.1). Die anschließende Aktivitätsmessung der Enzymvarianten erfolgte photometrisch in Anlehnung an die Sättigungsbedingungen des Wildtyp-Enzyms At2g29350 (0,2 mM NAD(P)H und 5 mM 3MCH; Reinhardt, 2014). Unter den gewählten Bedingungen konnte für die beiden Varianten At2g29350(A48D) und At2g29350(K27S,A48D) keine Aktivität gemessen werden. Beim weiteren Betrachten der Homologiemodelle fiel auf, dass sich in At2g29330 in räumlicher Nähe zum Aspartat (D40) ein kleines Alanin (A18) befindet. In At2g29350 liegen hingegen in den analogen Positionen ein Alanin (A48, vergl. D40) und ein Serin (S26, vergl. A18) vor. Wird das A48 nun zu einem Aspartat mutiert, so kommen sich S26 und das neu eingeführte D48 in At2g29350(A48D) und At2g29350(K27S,A48D) unter Umständen sehr nahe, wodurch es zu elektrostatischer Abstoßung und/oder sterischer Hinderung kommen könnte. Hieraus könnte die Inaktivität der beiden Enzymvarianten unter den Standardbedingungen des Wildtyp-Enzyms resultieren. Auf Basis dieser Überlegung wurde die Enzymvariante At2g29350(S26A,A48D) hergestellt und ebenfalls im Standardassay für das Wildtyp-Enzym vermessen. Da unter den Standardbedingungen nur mit NADH eine geringe Aktivität gemessen werden konnte, wurde die Cosubstrat- und Substratkonzentration

3 Ergebnisse

schrittweise erhöht. Abbildung 3.2 zeigt, dass die messbare Enzymaktivität von At2g29350-(S26A,A48D) mit zunehmender Cosubstrat- und Substratkonzentration ansteigt.

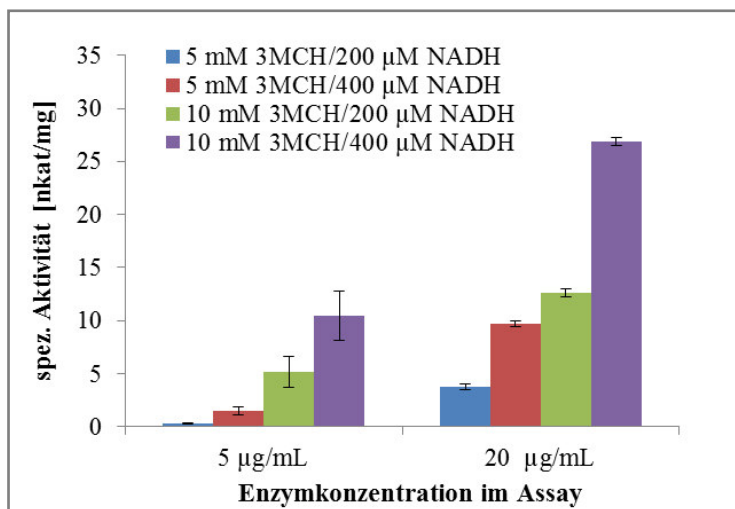


Abb. 3.2: Abhängigkeit der Enzymaktivität von At2g29350(S26A,A48D) von der Substrat- und Cosubstratkonzentration. Die photometrischen Messungen der Absorptionsänderung von NADH bei 340 nm wurden bei pH 7,5, 30 °C und einer Reaktionszeit von 6 min durchgeführt. Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit jeweils vier technischen Replikaten (n = 4).

Da bei einer geringen Enzymkonzentration von 5 µg/mL die Messungen noch mit starken Abweichungen behaftet waren, wurden die Messungen zusätzlich mit höheren Enzymkonzentrationen (20, 50, 100 µg/mL) durchgeführt. Für die NADH-Messungen bestätigten die hohen Enzymkonzentrationen das Verhalten (Abb. 3.2; 20 µg/mL). Mit NADPH konnte unter keiner der getesteten Bedingungen eine Aktivität gemessen werden. Somit wurde davon ausgegangen, dass At2g29350(S26A,A48D) ausschließlich mit NADH aktiv ist. Auf Grund der steigenden Aktivität mit steigender Cosubstrat- und Substratkonzentration wurde für weitere Enzymvarianten mit der Mutationsstelle A48D folgende Festlegung getroffen: sollte unter Standardbedingungen (0,4 mM NAD(P)H, 10 mM 3MCH, 30 °C, 20 µg/ml Enzym, Reaktionszeit 6 min) keine Abnahme der Absorption und damit der Cosubstratkonzentration messbar sein, so wird das entsprechende Enzym als inaktiv klassifiziert. Da bekannt war, dass die Aktivität der TRL stark pH-abhängig ist (Reinhardt, 2014), wurde der Standardassay zudem bei drei verschiedenen pH-Werten (Citrat/Phosphat-Puffer (CPP) pH 5,0; Kaliumphosphatpuffer (KPP) pH 6,0 und pH 7,0) durchgeführt. Für aktive Enzyme wurde anschließend die Produktbildung mittels GCMS verifiziert (Abschnitt 2.2.8).

Die Enzymvariante At2g29350(S26A,A48D) zeigte strikte Aktivität mit NADH, diese war jedoch im Vergleich zur Aktivität des Wildtyp-Enzyms mit NADPH (ca. 40 nkat/mg; Abb. 3.6) geringer. Mit dem Ziel, die Aktivität von At2g29350(S26A,A48D) zu erhöhen wurden

3 Ergebnisse

zusätzlich die basischen Aminosäuren in Anlehnung an At2g29330 ausgetauscht. Folgende Enzymvarianten wurden generiert: At2g29350(S26A,K27S,A48D), At2g29350(S26A,A48D,-R49I) und At2g29350(S26A,K27S,A48D,R49I). Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über die Enzymaktivitäten sämtlicher Varianten von At2g29350. Es zeigte sich, dass auch At2g29350-(A48D) unter erhöhten Substrat- und Cosubstratkonzentrationen eine sehr geringe Aktivität von ca. 1,6 nkat/mg für NADH aufwies und diese durch den Austausch des Serins in Position 26 auf 24,3 nkat/mg gesteigert werden konnte. Der zusätzliche Austausch der basischen Aminosäuren K27S und R49I reduzierte die Enzymaktivität. Auffällig für die aktiven Enzymvarianten war zudem, dass die höchste Aktivität immer bei pH 7,0 gemessen wurde. Das pH-Optimum des Wildtyp-Enzyms lag im Vergleich dazu bei pH 5,5 (KPP; vergl. Abschnitt 3.1.4.1).

Tab. 3.1: Spezifische Aktivitäten der Enzymvarianten von At2g29350. Varianten mit Mutation A48D: 20 µg/mL Enzym, 0,4 mM NAD(P)H, 10 mM 3MCH, 30 °C. Varianten ohne Mutation A48D: 5 µg/mL Enzym, 0,2 mM NAD(P)H, 5 mM 3MCH, 30 °C. Photometrische Messungen der Absorptionsänderung von NAD(P)H bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit vier technischen Replikaten (n = 4).

Enzymvarianten von At2g29350	spez. Aktivität [nkat/mg] (NADPH)			spez. Aktivität [nkat/mg] (NADH)		
	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
A48D	-	-	-	-	-	1,6 ± 0,3
K27S,A48D	-	-	-	-	-	-
S26A,A48D	-	-	-	-	8,5 ± 1,4	24,3 ± 1,7
S26A,K27S,A48D	-	-	-	-	0,9 ± 0,2	2,4 ± 0,1
S26A,A48D,R49I	-	-	-	-	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,3
S26A,K27S,A48D,R49I	-	-	-	-	-	-
S26A,K27S,A48D,D50A	-	-	-	-	0,8 ± 0,2	3,4 ± 0,5
S26A,A48D,V103A	-	-	-	-	-	-
K27S	-	48,0 ± 2,5	26,0 ± 2,0	-	-	-
V103A	-	84,3 ± 2,9	108,0 ± 3,9	-	-	-

Eine Simulation der Enzymvariante At2g29350(S26A,A48D) basierend auf dem Homologie-modell (Simulation erstellt von J. FISCHER) führte zu der Hypothese, dass K27 zum D50 eine Wasserstoffbrückenbindung ausbildet, wodurch D50 nicht mit dem dicht benachbarten D48 interagiert (Abb. 3.3). Durch den Austausch K27S kann diese Wasserstoffbrückenbindung nicht mehr ausgebildet werden und die Folgen wären unter Umständen eine sterische Hinderung und/oder eine elektrostatische Abstoßung zwischen den beiden Aspartaten, welche die Bindung von D48 zum NADH erschwert. Aus diesem Grund wurde in At2g29350(S26A,-

3 Ergebnisse

K27S,A48D) D50 gegen ein Alanin ausgetauscht. Die spezifische Aktivität von At2g29350(S26A,K27S,A48D,D50A) zeigte jedoch nur einen geringen, nicht signifikanten Anstieg (Tab. 3.1; pH 7,0) gegenüber At2g29350(S26A,K27S,A48D). Die Ergebnisse zeigen, dass der Austausch der basischen Aminosäuren (K27 und R49) für die Änderung der Cosubstratpräferenz von NADPH zu NADH von At2g29350 nicht relevant ist.

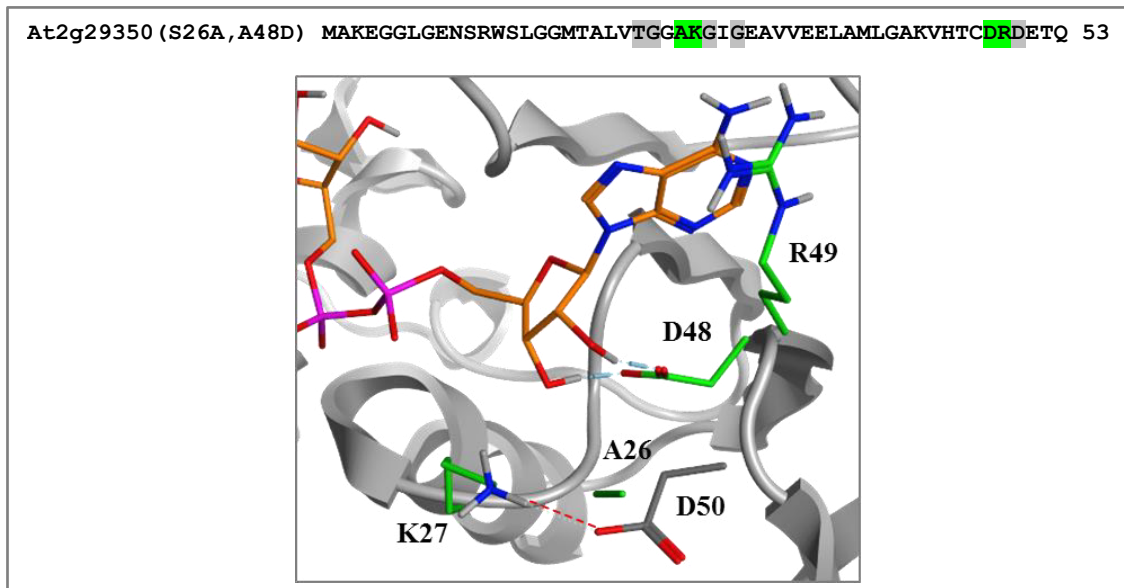


Abb. 3.3: Simulation der (N)-terminalen Struktur von At2g29350(S26A,A48D). Basierend auf dem Homologiemodell von At2g29350 (Fischer, 2015). Simulation und Abbildung erstellt von J. FISCHER. Orange: NADH, grün: relevante Aminosäuren im Cosubstratbindebereich, grau: D50 und Glycin-reiches Motiv in Sequenz. Rot gestrichelt: Wasserstoffbrücke.

Im Vergleich zu CoTR mit einer spezifischen Aktivität für beide Cosubstrate (79% Sequenzidentität zur At2g29350) zeigt die Sequenz von At2g29350 einen auffälligen Unterschied. Im konservierten Motiv NNAG besitzt At2g29350 (und die anderen TRL aus *A. thaliana*) in dritter Position ein Valin statt eines Alanins (Abb. 3.4). Diese Position ist interessant, weil sie direkt hinter dem Adeninring des Cosubstrats lokalisiert ist und die Größe der vorhandenen Seitenkette somit Einfluss auf die Cosubstratbindung haben könnte. Um dies zu überprüfen, wurde die Enzymvariante At2g29350(S26A,A48D,V103A) hergestellt und vermessen (Tab. 3.1). Es zeigte sich, dass der Austausch des Valins in ein Alanin zum vollständigen Verlust der Aktivität führt. Zusätzlich zu den Enzymvarianten mit der Mutationsstelle A48D, welche in ihrer Aktivität eine starke Abhängigkeit von Substrat- und Cosubstratkonzentration aufwiesen, wurden zwei Varianten ohne die Mutation A48D als Gegenprobe hergestellt. Zum einen wurde At2g29350(K27S) erzeugt, in der eine der beiden basischen Aminosäuren ausgetauscht ist und zum anderen wurde der Einfluss der Mutation V103A auf das Wildtyp-Enzym untersucht. Die Aktivität der Varianten wurde unter den Standardbedingungen für At2g29350 bestimmt

3 Ergebnisse

(Tab. 3.1). At2g29350(K27S) zeigte eine Aktivität mit NADPH im Bereich des Wildtyp-Enzyms und keine mit NADH. Für At2g29350(V103A) wurde hingegen eine höhere Aktivität mit NADPH als für At2g29350 erhalten. At2g29350(V103A) wies zudem, wie die mit NADH aktiven Enzymvarianten, die höchste Aktivität bei pH 7,0 auf.

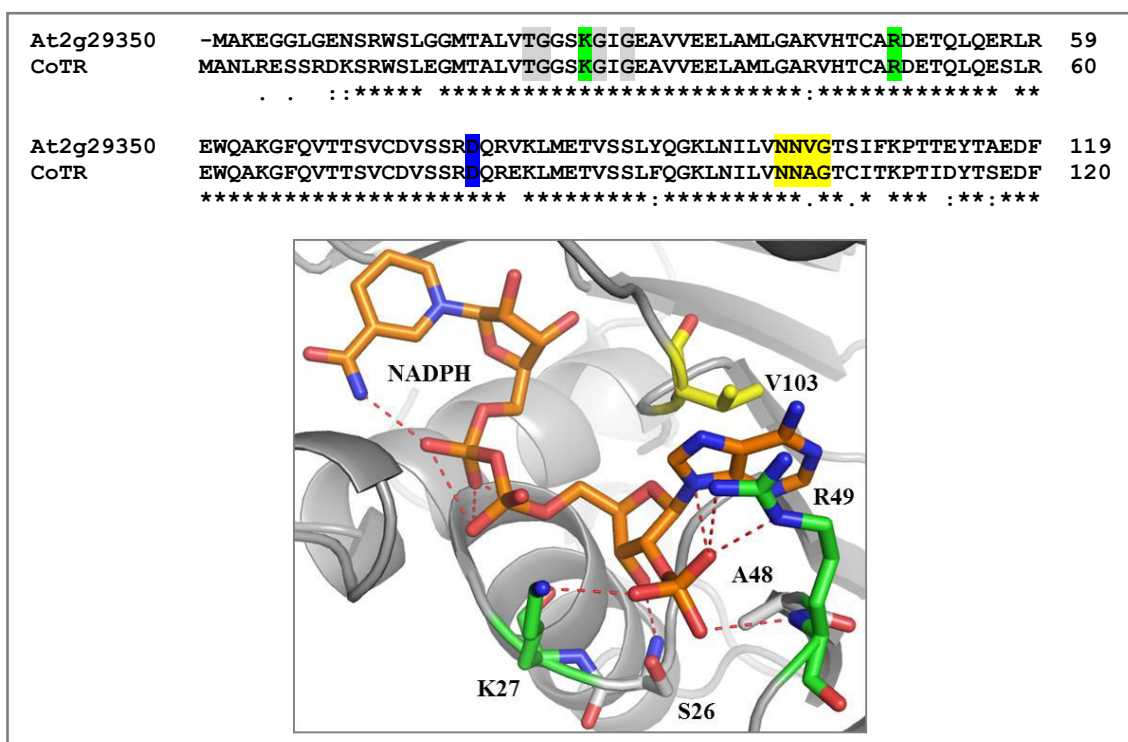


Abb. 3.4: Sequenzalignment der N-terminalen Bereiche von At2g29350 und CoTR sowie Strukturmodell der Cosubstratbinderegion von At2g29350. Alignment: grau: Glycin-reiches Motiv; gelb: Motiv zur Stabilisierung des zentralen β -Faltblattes; grün: basische Aminosäuren für die NADP(H)-Bindung; dunkelblau: konserviertes Aspartat zur Stabilisierung des Dinukleotid-Adenosins. Strukturmodell (Fischer, 2015): orange: NADPH. Relevante Aminosäuren wurden als Sticks dargestellt: grün: basische Aminosäuren im Glycin-reichen Motiv und nach dem zweiten β -Faltblatt (β B); gelb: V103 im NNVG-Motiv; grau: S26 und A48. Rot gestrichelt: Wasserstoffbrücken.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die Cosubstratspezifität von At2g29350 von NADPH zu NADH durch die alleinige Einführung der sauren Aminosäure (A48D) nicht hinreichend ändern lässt. Es bedurfte einer zweiten Mutation des in räumlicher Nähe befindlichen S26, um eine gut messbare Aktivität mit NADH zu erhalten. Weitere Enzymvarianten basierend auf den Sequenzinformationen und Modellstrukturen führten hingegen zu keiner Verbesserung der enzymatischen Aktivität gegenüber dem Cosubstrat NADH.

3.1.2 Änderung der Cosubstratpräferenz von CoTR und At2g29360

Auf Grund der hohen Sequenzidentität von At2g29350 zu CoTR (79%) und den anderen TRL aus *A. thaliana* (u.a. At2g29360, 80%), sollte geprüft werden, ob die Mutation an den homologen Sequenzpositionen in CoTR und At2g29360 ebenfalls zur Änderung der Cosubstrat-

3 Ergebnisse

präferenz von NADPH zu NADH führt (vergl. Abb. 3.1). Ein zusätzlicher Vergleich der Co-substratbinderegion im Homologiemodell von CoTR mit dem Modell von At2g29330 unterstützte die Vermutung, dass auch in CoTR neben der Einführung des Aspartats am Ende des zweiten β -Faltblattes ein zusätzlicher Austausch des Serins im Glycin-reichen Motiv nötig ist, um elektrostatischer Abstoßung und/oder sterischer Hinderung zwischen D49 und S27 zu verhindern (Abb. 6.13 und 6.12, Anhang). Aus diesem Grund wurden die vier Enzymvarianten At2g29360(A49D), At2g29360(S27A,A49D), CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) hergestellt. Erste Aktivitätsmessungen zeigten, dass sich die Mutationen auf die Aktivität der strikt mit NADPH aktiven At2g29360 stärker auswirkten als auf CoTR. In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse der Aktivitätsmessungen für die beiden Enzymvarianten ausgehend von At2g29360 aufgelistet. Anhand der Ergebnisse war zu sehen, dass sich At2g29360(A49D) und At2g29360(S27A,A49D) ähnlich wie die analogen At2g29350-Varianten verhalten. Die Einführung des Aspartats führte zu einem NADH-spezifischen Enzym mit geringer Aktivität und durch den zusätzlichen Austausch des Serins wurde die Aktivität leicht gesteigert.

Tab. 3.2: Enzymaktivität von At2g29360(A49D) und At2g29360(S27A,A49D). 20 $\mu\text{g/mL}$ Enzym, 0,4 mM NAD(P)H, 10 mM 3MCH, 30 °C. Photometrische Messungen der Absorptionsänderung von NAD(P)H bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit vier technischen Replikaten ($n = 4$).

Enzymvarianten von At2g29360	spez. Aktivität [nkat/mg] (NADPH)			spez. Aktivität [nkat/mg] (NADH)		
	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
A49D	-	-	-	-	-	1,6 \pm 0,4
S27A,A49D	-	-	-	-	1,6 \pm 0,5	2,8 \pm 0,3

Die spezifische Aktivität der beiden Enzymvarianten ausgehend von CoTR wurde bei Substratkonzentrationen von 1 und 5 mM getestet, um eventuelle Einflüsse der Substratkonzentration auszuschließen (Reinhardt, 2014). Da durch die Einführung des Aspartats auch für die mutierten CoTR-Varianten eine Verschiebung des pH-Optimums zu pH 6,0-7,0 erwartet wurde, wurden die Aktivitätstests bei pH 6,0 (KPP) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, dass CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) die Aktivität für NADPH und NADH beibehalten haben (Tab. 3.3).

Tab. 3.3: Enzymaktivität von CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D). 2,5 $\mu\text{g/mL}$ Enzym, 0,25 mM NAD(P)H, pH 6,0 (KPP), 30 °C. Photometrische Messungen der Absorptionsänderung von NAD(P)H bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit vier technischen Replikaten ($n = 4$).

Enzymvarianten von CoTR	spez. Aktivität [nkat/mg] (NADPH)		spez. Aktivität [nkat/mg] (NADH)	
	1 mM 3MCH	5 mM 3MCH	1 mM 3MCH	5 mM 3MCH
A49D	24,6 \pm 1,7	32,6 \pm 1,4	85,7 \pm 3,0	64,1 \pm 0,8
S27A,A49D	19,1 \pm 2,7	30,2 \pm 1,0	77,1 \pm 4,6	49,4 \pm 2,3

3 Ergebnisse

Auffällig war jedoch, dass im Gegensatz zur Messung mit NADPH, bei der sich die Aktivität mit der Erhöhung der Substratkonzentration steigern ließ, die spezifische Aktivität bei der Messung mit NADH abnahm.

3.1.3 Proteinproduktion und Aufreinigung der Enzymvarianten

Nach dem gezielten Austausch von Aminosäuren in den Sequenzen der drei Proteine At2g29350, At2g29360 und CoTR mittels Mutagenese-PCR erfolgte die Proteinproduktion als rekombinante Proteine in *E. coli* und die Aufreinigung mit immobilisierter Metallionenaffinitätschromatographie (Abschnitte 2.2.4.1 und 2.2.4.2). Die Aufreinigung anhand des Protokolls für das Wildtyp-Enzym At2g29350 (Reinhardt, 2014) erforderte Optimierung, da die Enzymvarianten von At2g29350 bis zu doppelt so stark exprimiert wurden, als das rekombinante Wildtyp-Enzym. Im Zuge dieser Optimierung konnten zusätzlich die Ausbeuten der Wildtyp-Enzyme At2g29350 und CoTR gesteigert werden (Tab. 6.16, Anhang). Die Ausbeute für At2g29350 lag zwischen 27-57 mg/L Medium (16-23 mg/L Medium; Reinhardt, 2014) und zwischen 80-127 mg/L Medium für die Enzymvarianten von At2g29350 (Ausnahme At2g29350(V103A): 34 mg/L Medium). Für CoTR lag die Proteinausbeute zwischen 52-66 mg/L Medium (9-16 mg/L Medium; Reinhardt, 2014) und für die beiden Enzymvarianten zwischen 67-68 mg/L Medium. At2g29360 lieferte die geringste Proteinausbeute von 13 mg/L Medium und die beiden Enzymvarianten von 28-65 mg/mL Medium. Die genauen Angaben für jede Enzymvariante sind in Tabelle 6.17 im Anhang aufgelistet. Die Reinheit nach der Metallionenaffinitätschromatographie betrug für At2g29350 ($M_{\text{Monomer}} = 30,3$ kDa), At2g29360 ($M_{\text{Monomer}} = 30,5$ kDa) und die verschiedenen Enzymvarianten der beiden Enzyme ca. 95%, da die SDS-Gele eine schwache zusätzliche Proteinbande bei 66 kDa zeigten (Abb. 3.5a und b).

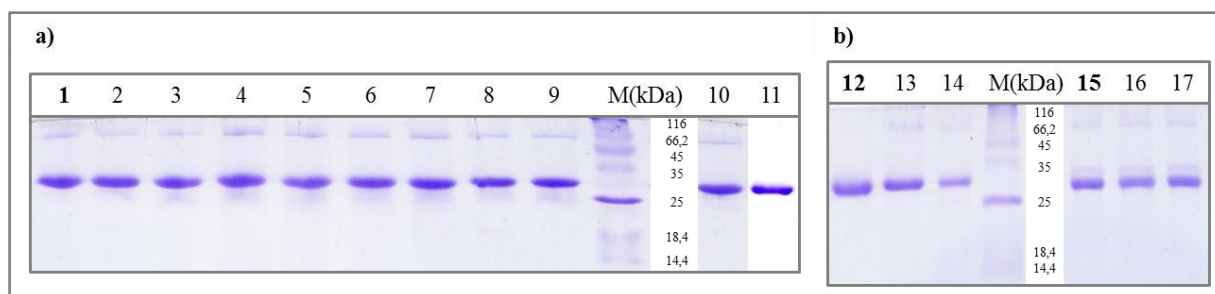


Abb. 3.5: SDS-Gele der mittels Metallionenaffinitätschromatographie aufgereinigten Proteinchargen. Jeweils 1,3 µg Protein aufgetragen. a) 1: At2g29350; 2: At2g29350(A48D); 3: At2g29350(K27S,A48D); 4: At2g29350(S26A,A48D); 5: At2g29350(S26A,K27S,A48D); 6: At2g29350(S26A,A48D,R49I); 7: At2g29350-(S26A,K27S,A48D,R49I); 8: At2g29350(S26A,A48D,V103A); 9: At2g29350(S26A,K27S,A48D,D50A); 10: At2g29350(K27S); 11: At2g29350(V103A); b) 12: At2g29360; 13: At2g29360(A49D); 14: At2g29360(S27A,-A49D); 15: CoTR; 16: CoTR(A49D); 17: CoTR(S27A,A49D).

3 Ergebnisse

Für CoTR ($M_{\text{Monomer}} = 30,8 \text{ kDa}$), CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) lagen die Reinheiten zwischen 90-95% (Abb. 3.5b), da neben einer sehr schwachen Bande bei 66 kDa auch ein etwas stärkere Bande bei ca. 30-35 kDa zu sehen war. LC-MS-Messungen (Dr. W. Hoehenwarter, Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Halle, Abteilung Proteomanalytik) zeigten, dass es sich bei der Bande bei 30-35 kDa um ribosomale *E. coli*-Proteine handelt. Wurden die gereinigten Proteinchargen bei $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, wiesen sie anhand von Aktivitätsmessungen eine Stabilität von >1 Jahr auf.

3.1.4 Charakterisierung der Enzymvarianten

3.1.4.1 pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität

Zunächst wurde die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität für das Wildtyp-Enzym At2g29350 ermittelt (Abb. 3.6a). At2g29350 wies ein pH-Optimum für die Reduktionsreaktion bei pH 5,5 (KPP) auf. Zusätzlich war ein Einfluss des gewählten Puffersystems im sauren Bereich zu sehen. Die Aktivität lag bei pH 5,5 im Kaliumphosphatpuffer 3x höher als im Citrat/Phosphat-Puffer. Für die Oxidation lag das pH-Optimum bei pH 8,5 (THP) bis pH 9,0 (GNP). Im Vergleich zur Reduktion war die pH-Abhängigkeit der Oxidation nur sehr schwach ausgeprägt. Für At2g29350(S26A,A48D) zeigte sich eine Verschiebung des pH-Optimums der Reduktion im Vergleich zum Wildtyp-Enzym in den neutralen Bereich (pH 7,5 KPP; Abb. 3.6c). Das pH-Optimum der Oxidation lag hingegen wie für das Wildtyp-Enzym bei pH 8,5 (THP) bis pH 9,0 (GNP). Neben der Verschiebung des pH-Optimums zeigten die Messungen mit At2g29350(S26A,A48D) zudem, dass das gewählte Puffersystem für die Aktivität der Enzymvariante ebenfalls von großer Bedeutung ist. Während bei pH 7,5 im Kaliumphosphatpuffer die höchste Aktivität gemessen werden konnte, fällt die Aktivität bei pH 7,5 im Tris/HCl-Puffer auf ca. 10% ab. Die drei weiteren mit NADH aktiven Varianten (At2g29350(S26A,-K27S,A48D), At2g29350(S26A,A48D,R49I), At2g29350(S26A,K27S,A48D,D50A)) wiesen ebenfalls ein pH-Optimum bei pH 7,5 (KPP) auf. Zudem war im Tris-Puffer pH 7,5 keine Aktivität messbar (Abb. 6.2, Anhang). Die beiden mit NADPH aktiven Enzymvarianten At2g29350(K27S) und At2g29350(V103A) zeigten pH-Optima bei pH 6,0 und 6,4 (KPP) für die Reduktion und bei pH 9,5 (GNP) und 7,5 (KPP) für die Oxidation (Abb. 6.2, Anhang). Die Messung der pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität für At2g9360(S27A,A49D) offenbarte, dass sich das pH-Optimum für die Reduktion in ähnlicher Weise wie für At2g29350(S26A,-A48D) in den neutralen Bereich verschiebt (Abb. 3.6d; pH-Optimum von At2g29360: pH 6,0 (KPP); Reinhardt, 2014). Der Einfluss des Puffersystems war im Gegensatz zu At2g29350(S26A,A48D) jedoch nicht stark ausgeprägt. Als interessante Beobachtung konnte festgehal-

3 Ergebnisse

ten werden, dass sich das pH-Optimum für die Oxidation ebenfalls in den neutralen Bereich verschoben hat (pH-Optimum von At2g29360: pH 9,0 (GNP); Reinhardt, 2014) und somit sowohl für die Reduktion als auch für die Oxidation bei pH 7,5 (KPP) liegt.

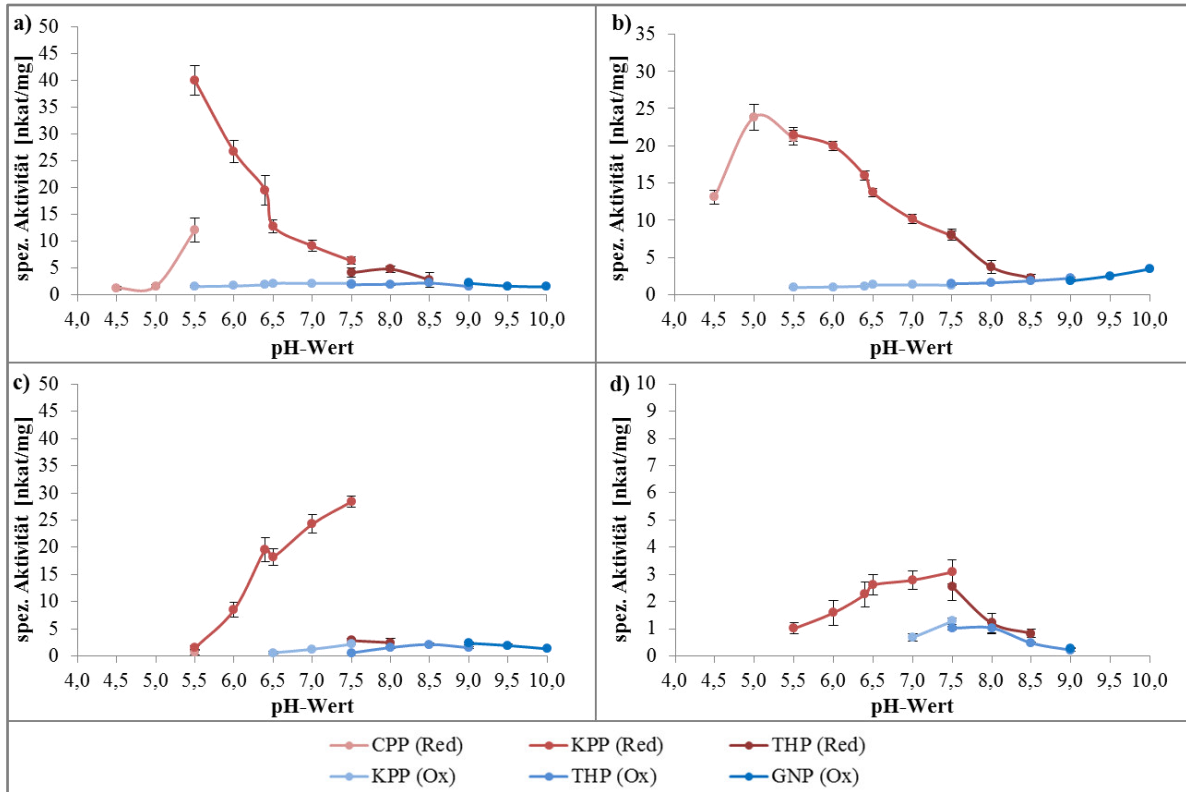


Abb. 3.6: Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert. a) At2g29350: Reduktion (rot): 5 mM 3MCH, 0,2 mM NADPH, Oxidation (blau): 5 mM 3MCHol, 0,4 mM NADP⁺; b) CoTR: Reduktion (rot): 1 mM 3MCH, 0,2 mM NADPH, Oxidation (blau): 2 mM 3MCHol, 0,4 mM NADP⁺; c) At2g29350(S26A,A48D): Reduktion (rot): 10 mM 3MCH, 0,4 mM NADH, Oxidation (blau): 10 mM 3MCHol, 0,6 mM NAD⁺; d) At2g29360(S27A,-A49D), Bedingungen entsprechend At2g29350(S26A,A48D). Reduktion: pH 4,5-9,0; Oxidation: pH 5,5 -10,0; 30 °C. Photometrische Messung der Absorptionsänderung von NAD(P)(H) bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit vier technischen Replikaten (n = 4). CPP: Citrat/Phosphat-Puffer; KPP: Kaliumphosphatpuffer; THP: Tris/HCl-Puffer; GNP: Glycin/NaOH-Puffer.

Die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität des Wildtyp-Enzyms CoTR zeigte ein pH-Optimum bei pH 5,0 (CPP) für die Reduktion und bei pH 10,0 (GNP) für die Oxidation (Abb. 3.6b). Die beiden Varianten CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) wiesen hingegen keine Verschiebung der pH-Optima der Reduktion ins Neutrale auf, wie es bei den entsprechenden Enzymvarianten der TRL zu beobachten war. CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) zeigten wie das Wildtyp-Enzym ein pH-Optimum für die Reduktion bei pH 5,0 (CPP) und für die Oxidation bei pH 10,0 (GNP) (Abb. 6.2, Anhang).

3 Ergebnisse

3.1.4.2 Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität

Die Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität wurde für At2g29350, At2g29360 und CoTR sowie die vier Enzymvarianten At2g29350(S26A,A48D), CoTR(A49D), CoTR(S27A,A49D) und At2g29360(S27A,A49D) zwischen 20 und 40 °C bestimmt (Abb. 3.7).

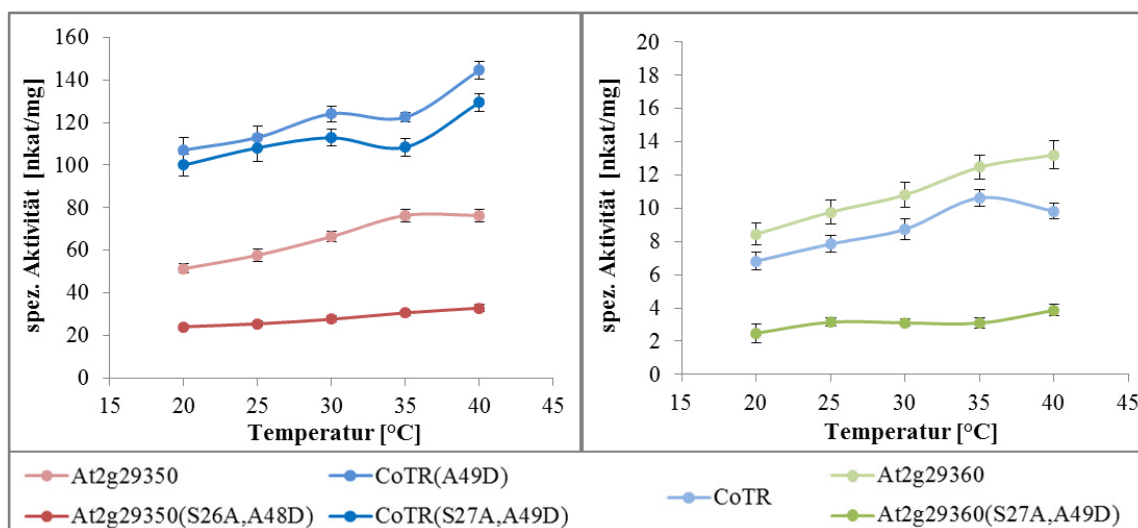


Abb. 3.7: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Temperatur. Wildtyp-Enzyme der TRL: 5 mM 3MCH, 0,2 mM NADPH. Varianten der TRL: 10 mM 3MCH, 0,4 mM NADH. CoTR: 1 mM 3MCH, 0,2 mM NADPH. CoTR-Varianten: 1 mM 3MCH, 0,25 mM NADH. Alle Messungen wurden bei den pH-Optima der Proteine durchgeführt. Photometrische Messung der Adsorptionsänderung von NAD(P)H bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit vier technischen Replikaten (n = 4).

Für alle Proteine zeigte sich, dass eine Temperaturerhöhung mit einer Erhöhung der spezifischen Aktivität einhergeht. So stieg die spezifische Aktivität der Enzyme bei einer Temperaturerhöhung von 20 °C auf 40 °C um ca. 30-56% an. Wurde die Aktivitätsabnahme zwischen 30 °C und 20 °C betrachtet, so lag diese für alle Proteine zwischen 11-23%.

3.1.4.3 Cosubstratstabilität in Abhängigkeit von Temperatur und pH-Wert

Die Ergebnisse des Stabilitätstests sind in Abbildung 3.8 gezeigt. Für den Test wurde in Anlehnung an den Standardlager- und die Assaypuffer ein Kaliumphosphatpuffer (25 mM KPP, 125 mM NaCl, 1 mM DTT) ausgewählt. Anhand der pH-Optima für die enzymatischen Umsetzungen wurden die pH-Werte pH 5,5 und pH 7,5 und zusätzlich pH 7,0 getestet. Um den Einfluss der Pufferkonzentration zu testen wurden die Ansätze zusätzlich 1:10 mit Wasser verdünnt. Zu beobachten war, dass die Konzentration von NADH bei neutralem pH-Wert (pH 7,0 und pH 7,5) unabhängig von Temperatur und Pufferkonzentration über die 8 h nahezu konstant ist (Abb. 3.8a und b). Bei pH 5,5 hingegen konnte über 8 h ein deutlicher Abbau des Cosubstrats beobachtet werden. Dieser wurde zudem durch eine höhere Pufferkonzentration

3 Ergebnisse

und Temperatur begünstigt. Im Vergleich zum NADH zeigte NADPH nur bei pH 7,5 und 20 °C eine weitgehende Stabilität über 8 h unabhängig von der Pufferkonzentration (Abb. 3.8c und d). Unter allen anderen untersuchten Bedingungen kam es über 8 h zum Abbau des Cosubstrats, der zusätzlich durch höhere Temperaturen und vor allem durch einen sauren pH-Wert begünstigt wurde. So hatte sich bei einem pH-Wert von 5,5, einer Temperatur von 30 °C und einer Pufferkonzentration von 25 mM nach 8 h fast das gesamte Cosubstrat zersetzt.

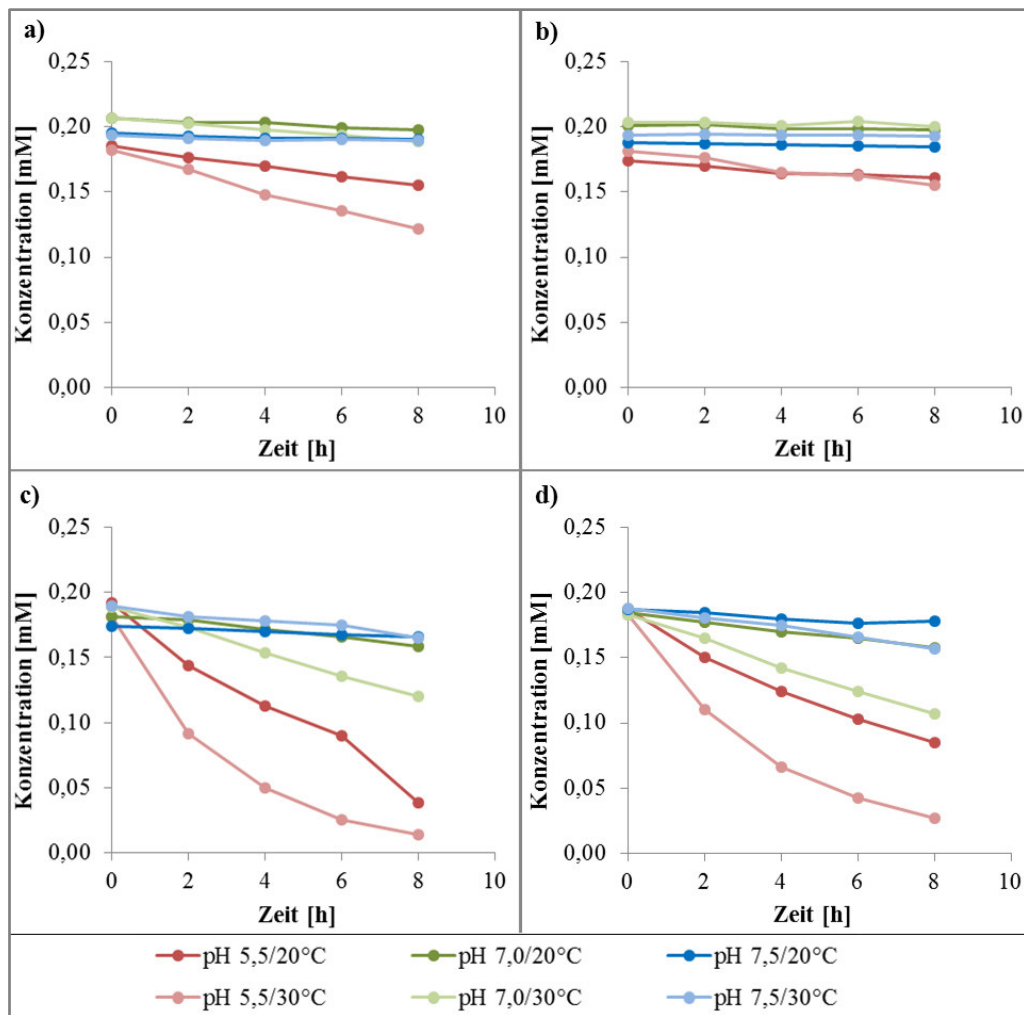


Abb. 3.8: Stabilitätstest für NADH und NADPH bei 20 °C und 30 °C sowie pH 5,5, pH 7,0 und pH 7,5. a) NADH, 25 mM Pufferkonzentration; b) NADH, 2,5 mM Pufferkonzentration; c) NADPH, 25 mM Pufferkonzentration; d) NADPH, 2,5 mM Pufferkonzentration. Photometrische Messungen der Absorption bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit zwei technischen Replikaten (n = 2).

3.1.4.4 Kinetische Parameter für die enzymatische Umsetzung von Substrat und Cosubstrat

Im Vergleich zum Wildtyp-Enzym At2g29350, das bei kinetischen Messungen mit NADPH und 3MCH hyperbolische Kurvenverläufe entsprechend Michaelis und Menten (1913) zeigte (Reinhardt, 2014), ergaben die Messungen mit der NADH-abhängigen Enzymvariante

3 Ergebnisse

At2g29350(S26A,A48D) sigmoide Kurvenverläufe entgegen dem Michaelis-Menten-Modell (Abb. 3.9a und b). Eine Sättigung des Enzyms mit NADH konnte zudem im Konzentrationsbereich bis 0,8 mM nicht erreicht werden. Da die photometrische Absorptionsmessung ab einer NAD(P)H-Konzentrationen $>0,8$ mM außerhalb des linearen Bereichs liegt, konnte die Cosubstratkonzentration nicht weiter gesteigert werden (vergl. Abb. 2.2, Material und Methoden). Aus diesem Grund wurde die Oxidation unter Verbrauch des Cosubstrats NAD^+ untersucht (Abb. 3.9c und d).

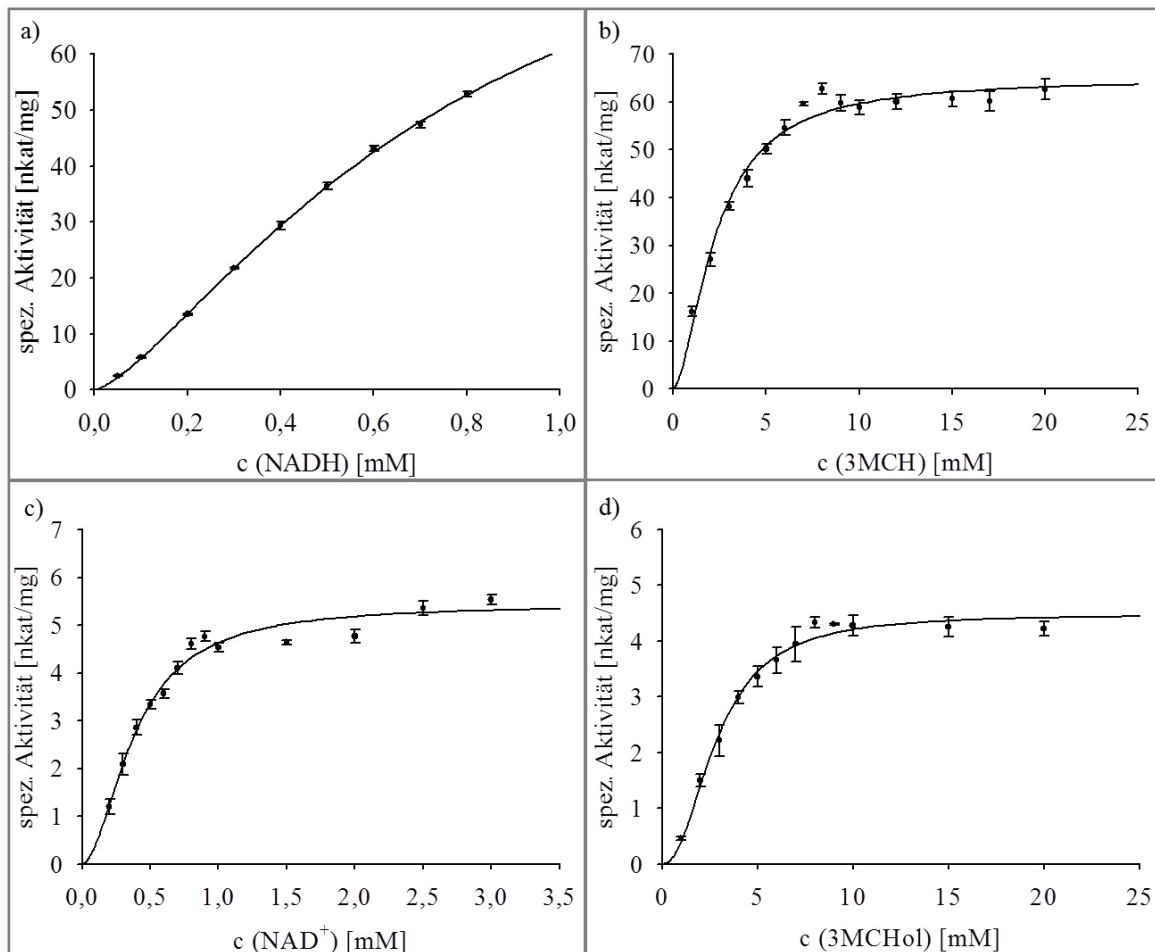


Abb. 3.9: Spezifische Enzymaktivität von At2g29350(S26A,A48D) in Abhängigkeit von Substrat- und Cosubstratkonzentration. Abhängigkeit von a) NADH-Konzentration (3MCH: 13 mM), b) 3MCH-Konzentration (NADH: 0,8 mM), c) NAD^+ -Konzentration (3MCHol: 15 mM), d) 3MCHol-Konzentration (NAD^+ : 2 mM). Messung bei den pH-Optima und 30 °C. Photometrische Messungen der Absorptionsänderung von NAD(H) bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus vier Wiederholungen mit vier technischen Replikaten ($n = 4$). Zur graphischen Betrachtung nach Hill (1910) geplottet.

Für die spezifischen Aktivitäten sowohl in Abhängigkeit von der NAD^+ - als auch von der 3MCHol-Konzentration zeigten sich sigmoide Kurvenverläufe und bestätigten somit das unterschiedliche Verhalten im Vergleich zum Wildtyp-Enzym. Durch den erhöhten Einsatz von NAD^+ konnte für dieses Cosubstrat eine Sättigung erzielt werden. Die Messungen der spezifi-

3 Ergebnisse

schen Enzymaktivität abhängig von der Substrat- und Cosubstratkonzentration von At2g29350(S26A,A48D) führten zu der Frage, ob der sigmoide Verlauf mit der Änderung der Cosubstratspezifität zusammenhängt. Aus diesem Grund wurden zum Vergleich die analogen Messungen für die beiden mit NADPH aktiven Enzymvarianten durchgeführt. Die beiden Varianten At2g29350(K27S) und At2g29350(V103A) zeigten für die Messungen der Enzymaktivität in Abhängigkeit von der Cosubstrat- bzw. Substratkonzentration für die Reduktion ein ähnliches Verhalten wie die mit NADH aktive At2g29350(S26A,A48) (Abb. 3.10a-d).

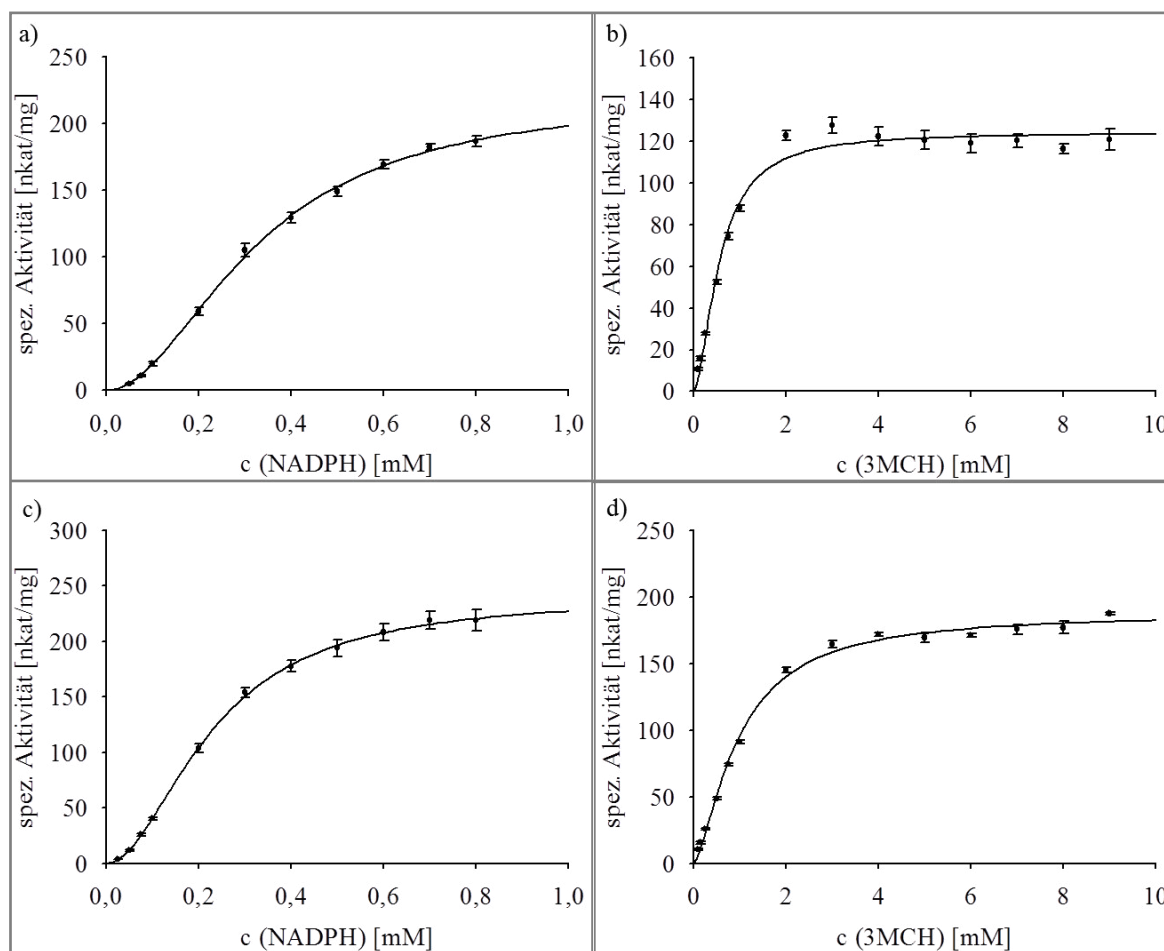


Abb. 3.10: Spezifische Enzymaktivität von At2g29350(K27S) und At2g29350(V103A) in Abhängigkeit von Substrat- und Cosubstratkonzentration. At2g29350(K27S): Abhängigkeit von a) NADPH-Konzentration (3MCH: 3 mM), b) 3MCH-Konzentration (NADPH: 0,8 mM); At2g29350(V103A): Abhängigkeit von c) NADPH-Konzentration (3MCH: 5 mM), d) 3MCH-Konzentration (NADPH: 0,8 mM). Messung bei den pH-Optima und 30 °C. Photometrische Messungen der Absorptionsänderung von NADPH bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus vier Wiederholungen mit vier technischen Replikaten (n = 4). Zur graphischen Betrachtung nach Hill (1910) geplottet.

Für die beiden Messungen mit NADPH wurden sigmoide Kurvenverläufe erhalten, die ab einer Konzentration von 0,8 mM langsam eine Sättigung andeuten. Die sigmoiden Kurven zeigten im Vergleich zu At2g29350(S26A,A48D) eine Substratsättigung bei geringerer Konzentration (2 mM bzw. 3 mM vs. 10 mM). Weiterhin war auffällig, dass für At2g29350-

3 Ergebnisse

(V103A) bei hohen Substrat- und Cosubstratkonzentrationen spezifische Aktivitäten von bis zu 200 nkat/mg erhalten wurden, während für das Wildtyp-Enzym maximal ca. 50 nkat/mg im gesättigten Bereich gemessen wurden (Reinhardt, 2014). Da sigmoide Kurvenverläufe häufig auf ein kooperatives Verhalten von oligomeren Enzymen hindeuten, wurde exemplarisch für At2g29350(S26A,A48D) im Vergleich zum Wildtyp-Enzym das native Molekulargewicht bestimmt (Abschnitt 3.1.4.5).

Die beiden mit NADH und NADPH aktiven CoTR-Varianten wurden kinetisch mit beiden Cosubstraten charakterisiert. Für CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) wurden analog zum Wildtyp-Enzym (Reinhardt, 2015) hyperbolische Kurvenverläufe erhalten, die entsprechend dem Modell von Michaelis und Menten (1913) geplottet werden konnten (Abb. 6.9a, c und d; Abb. 6.10a, c und d, Anhang).

Tab. 3.4: Kinetische Parameter von CoTR, CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) für die Reduktion mit 3MCH, NADPH und NADH. Ermittelt aus den kinetischen Untersuchungen sowie der Arbeit von N. REINHARDT ((* Reinhardt, 2015). Enzymkinetiken abhängig von der Substratkonzentration: 0,1-9 mM 3MCH, NAD(P)H konstant (0,6 bzw. 0,7 und 0,8 mM); Enzymkinetiken abhängig von der Cosubstratkonzentration: 0,01-0,8 mM NAD(P)H, 3MCH konstant (0,5 bzw. 2 und 5 mM). 30 °C, pH 5,0 (CPP). Mittelwert und Standardabweichung aus vier Wiederholungen mit vier technischen Replikaten (n = 4) (**Ausnahme: drei Wiederholungen).

Kinetik	K_m [μ M]	K_i [μ M]	V_{max} [nkat/mg]	V_{opt} [nkat/mg]
CoTR				
NADH*	666,5 \pm 20,0	-	382,3 \pm 7,0	-
NADPH*	78,3 \pm 7,9	-	33,0 \pm 1,0	-
3MCH (NADH)**	3391,8 \pm 250,8	-	97,5 \pm 2,9	-
3MCH (NADPH)*	24,1 \pm 3,2	6641,0 \pm 2086,0	76,1 \pm 3,1	67,9 \pm 2,9
CoTR(A49D)				
NADH	239,8 \pm 19,6	-	254,4 \pm 7,7	-
NADPH	454,9 \pm 63,4	-	176,5 \pm 11,9	-
3MCH (NADH)	440,2 \pm 50,0	6395,1 \pm 748,0	235,1 \pm 12,3	154,2 \pm 8,1
3MCH (NADPH)	830,3 \pm 71,6	-	81,5 \pm 1,6	-
CoTR(S27A,A49D)				
NADH	119,5 \pm 12,7	-	237,4 \pm 7,2	-
NADPH	609,0 \pm 89,3	-	176,7 \pm 14,0	-
3MCH (NADH)	175,9 \pm 28,6	4165,1 \pm 542,6	192,2 \pm 11,6	136,2 \pm 8,0
3MCH (NADPH)	1285,2 \pm 141,9	-	74,0 \pm 2,2	-

3 Ergebnisse

Die einzige Ausnahme stellten die Umsetzungen von 3MCH mit NADH dar. Für beide Enzymvarianten wurde ein Kurvenverlauf entsprechend einer Substrat- bzw. Produktüberschuss-hemmung beobachtet (Abb. 6.9b und 6.10b, Anhang), ähnlich wie für das Wildtyp-Enzym mit NADPH (Reinhardt, 2015). Die kinetischen Parameter der beiden CoTR-Varianten sind zusammen mit den Daten des Wildtyp-Enzyms (Reinhardt, 2014) in Tabelle 3.4 aufgelistet. Das Wildtyp-Enzym zeigte eine ca. 8,5x höhere Affinität (K_m) zu NADPH als zu NADH. Durch die Einführung des D49 wies CoTR(A49D) hingegen eine ca. 1,9x höhere Affinität zu NADH als zu NADPH auf. Daraus ist ersichtlich, dass, obwohl die Enzymvariante weiterhin mit beiden Cosubstraten aktiv ist, sich die Präferenz im Gegensatz zum Wildtyp-Enzym von NADPH zu NADH geändert hat. Der zusätzliche Austausch von S27A verdoppelte die Affinität für NADH im Vergleich zu CoTR(A49D). Die Affinität zu NADPH verringerte sich auf ca. 12% des Wertes für CoTR.

Die Enzymvariante At2g29360(S27A,A49D) wurde kinetisch nicht weiter charakterisiert, da sie schon in den Aktivitätsassays eine äußerst geringe spezifische Aktivität (Tab. 3.2) zeigte.

3.1.4.5 Bestimmung des nativen Molekulargewichts

Enzyme, die sich nicht nach dem Modell von Michaelis und Menten (1913) verhalten und sigmoide Kurvenverläufe zeigen, weisen häufig ein kooperatives Verhalten (Hill, 1910) auf. Um dies zu überprüfen, wurde zuerst mittels analytischer Ultrazentrifugation (Abschnitt 2.2.4.7) das native Molekulargewicht exemplarisch für At2g29350(S26A,A48D) bestimmt. Zusätzlich wurde das Wildtyp-Enzym At2g29350 neu vermessen, da die beschriebene Trimerstruktur (Reinhardt, 2014) für klassische SDR nicht bekannt und zudem strukturell sehr unwahrscheinlich ist. Zusätzlich wurden At2g29360(S27A,A49D), CoTR, CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) untersucht.

Für die Ultrazentrifugation mussten zunächst Pufferbedingungen etabliert werden, unter denen die Enzyme über mehrere Stunden stabil sind. At2g29350 sowie At2g29350(S26A,A48D) und At2g29360(S27A,A49D) zeigten über einen Zeitraum von 6 h bei 20 °C keinen Verlust ihrer Aktivität in einem 25 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 mit 125 mM NaCl und 0,5 mM TCEP (Abb. 6.4, Anhang). CoTR blieb in einem 25 mM Tris/HCl-Puffer pH 7,5 mit 50 mM NaCl und 0,5 mM TCEP über 6 h stabil. Für die Vermessung von CoTR wurde diese erneut exprimiert und über die Affinitätschromatographie unter Verwendung eines Imidazolgradienten über 15 Säulenvolumen aufgereinigt. Dadurch konnten Fraktionen erhalten werden, die im SDS-Gel keine weiteren Proteinbanden zeigten und für die Ultrazentrifugation

3 Ergebnisse

eingesetzt wurden (Abb. 6.1a, Anhang). Für die Ultrazentrifugation wurden Proteinkonzentrationen von 0,04 und 0,3 mg/mL getestet. Die Messungen wurden von Priv.-Doz. Dr. H. Lillie (MLU, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Technische Biochemie) durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten für At2g29350, At2g29350(S26A,A48D) und At2g29360(S27A,A49D), dass die Enzymkonzentration einen starken Effekt auf das native Molekulargewicht der Enzyme hat (Tab. 3.5). So lagen alle drei Proteine bei einer Konzentration von 0,04 mg/mL als Dimer vor, wogegen bei einer Konzentration von ca. 0,3 mg/mL für At2g29350 und At2g29350(S26A,A48D) das apparente Molekulargewicht eines Trimers erhalten wurde. Da ein Trimer aus der Struktur nicht erklärbar ist, zeigen die Messungen folglich, dass Wildtyp-Enzym und Enzymvariante in einem von der Enzymkonzentration abhängigen Dimer-Tetramer-Gleichgewicht vorliegen müssen. Für At2g29360(S27A,A49D) offenbarte sich ein ähnliches Verhalten. Bei einer Enzymkonzentration von 0,3 mg/mL lag das Enzym als Tetramer vor (Tab. 3.5). Daraus lässt sich schließen, dass das Enzym ebenfalls in einem Dimer-Tetramer-Gleichgewicht vorliegt. Das Gleichgewicht liegt jedoch schon bei einer geringeren Proteinkonzentration als für At2g29350 und At2g29350(S26A,A48D) auf der Seite des Tetramers. Trotz der hohen Sequenzidentität zu At2g29350 zeigten CoTR und ihre beiden Enzymvarianten keinen Effekt der Enzymkonzentration auf das native Molekulargewicht. Sowohl das Wildtyp-Enzym als auch CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) liegen bei 0,04 mg/mL und 0,3 mg/mL als Tetramer vor (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: Ergebnisse der analytischen Ultrazentrifugation. M(app) = apparentes Molekulargewicht. 20 °C, 10.000 rpm; Einmalmessungen.

Wildtyp-Enzyme und Enzymvarianten	M _{Monomer} [kDa]	M(app) [kDa]	
		0,04 mg/mL	0,30 mg/mL
At2g29350	30,3	72,2	96,6
At2g29350(S26A,A48D)	30,3	77,3	92,5
At2g29360(S27A,A49D)	30,5	66,0	115,0
CoTR	30,8	120	120
CoTR(A49D)	30,8	117	117
CoTR(S27A,A49D)	30,8	113	113

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse stellte sich die Frage, ob die sigmoiden Kurvenverläufe der konzentrationsabhängigen Umsetzung von NADH und 3MCH von At2g29350(S26A,-A48D), ein rein kooperatives Verhalten des Enzyms widerspiegelt oder ob sich der Oligomerisierungszustand des Enzyms abhängig von Cosubstrat- und Substratkonzentration ändert. Diese Frage wurde über analytische Gelfiltration (Abschnitt 2.2.4.7) untersucht. Für At2g29350(S26A,A48D) wurde das Molekulargewicht unter verschiedenen Bedingungen bei

3 Ergebnisse

konstanter Enzymkonzentration (1,44 mg/mL) ermittelt. Da NAD(P)H und 3MCH wie die Proteine bei 280 nm absorbieren, erfolgte die Auswertung der Gelfiltrationsläufe nicht über die Chromatogramme der UV-Absorption, sondern über das Auftragen der Proteinfractionen 7-26 auf SDS-PAGE-Gele (Abb. 3.11). Für die Auswertung wurde anhand der Intensität der Banden das Elutionsmaximum abgeschätzt (blaue Kästen) und über die Kalibriergerade in das Molekulargewicht umgerechnet. Es wurde vorausgesetzt, dass das Elutionsmaximum jeweils im mittleren Bereich der markierten Fraktionen lag.

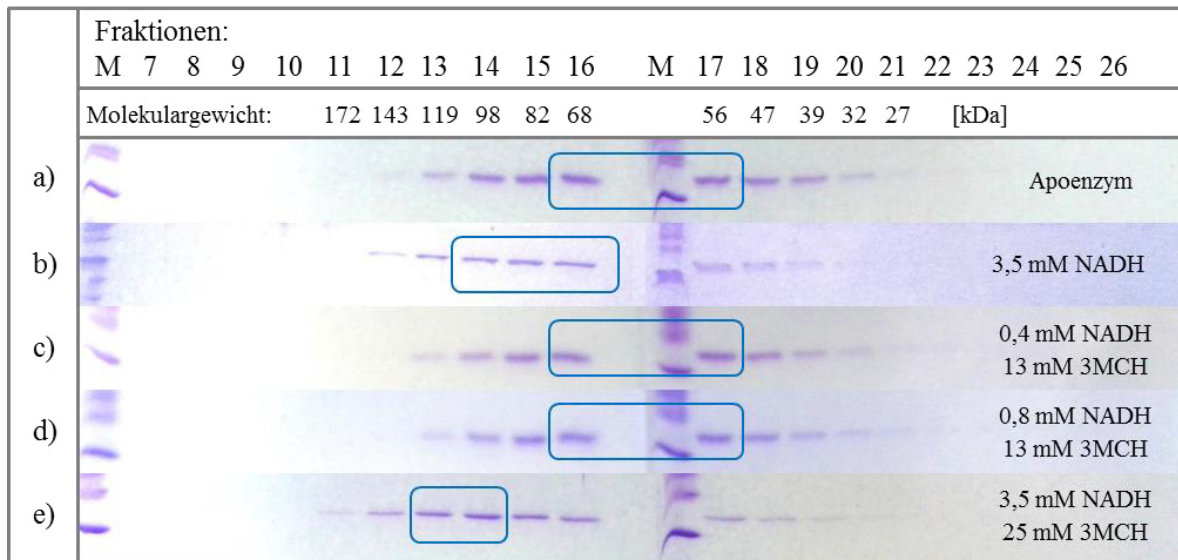


Abb. 3.11: Analyse der Gelfiltrationsläufe von At2g29350(S26A,A48D) mit SDS-PAGE. Enzymkonzentration: 1,44 mg/mL, 20 °C. Aufgetragen wurden die Proben der Fraktionen 7-26. Die Molekulargewichtsangaben entsprechen dem Mittel des Volumens der jeweiligen 2 mL-Fraktion, bestimmt über die Kalibriergerade. Blaue Kästen markieren die jeweiligen Elutionsmaxima. a) - e) Substrat- und Cosubstratkonzentrationen während der Gelfiltrationsläufe.

Für das Apoenzym lag das Elutionsmaximum (Abb. 3.11a) bei einem Molekulargewicht von ca. 62 kDa, was einem Dimer entspricht. Bei geschätzter Cosubstratsättigung in Anwesenheit von 3,5 mM NADH (vergl. Abb 3.9a) lag das Elutionsmaximum bei einem Molekulargewicht von ca. 81,7 kDa (Abb. 3.11b). Dieses entspricht dem Bereich zwischen einem Dimer und einem Tetramer. Danach wurde der Einfluss des Substrats untersucht, indem entsprechend Abbildung 3.9a und b zwei Bedingungen gewählt wurden, in denen das Protein mit Substrat, aber nicht mit Cosubstrat gesättigt ist. Bei 0,4 mM NADH und 13 mM 3MCH (Abb. 3.11c) sowie 0,8 mM NADH und 13 mM 3MCH (Abb. 3.11d) zeigten die SDS-Gele wie für das Apoenzym ein Molekulargewicht von ca. 62 kDa. Unter Bedingungen von Cosubstrat- und Substratsättigung (3,5 mM NADH, 25 mM 3MCH) lag das Elutionsmaximum bei einem viel geringeren Elutionsvolumen als unter den zuvor getesteten Bedingungen (Abb. 3.11e), was

3 Ergebnisse

einem Molekulargewicht von ca. 108 kDa entspricht. Dieses Molekulargewicht des nativen Proteins liegt im Bereich eines Tetramers.

Da für das Wildtyp-Enzym At2g29350 über die analytische Ultrazentrifugation ebenfalls ein enzymkonzentrationsabhängiges Dimer-Tetramer-Gleichgewicht ermittelt wurde, stellte sich die Frage, ob sich das native Molekulargewicht auch beim Wildtyp-Enzym abhängig von der Cosubstratkonzentration ändert. In Analogie zu At2g29350(S26A,A48D) wurde bei einer konstanten Enzymkonzentration (0,9 mg/mL) das native Molekulargewicht für das Apoenzym (Abb. 3.12a) und für das Enzym unter Cosubstratsättigung (Abb. 3.12b; 0,3 mM NADPH), Substratsättigung (Abb. 3.12c; 9 mM 3MCH, 0,15 mM NADPH) sowie unter gleichzeitiger Sättigung mit Cosubstrat und Substrat (Abb. 3.12d; 9 mM 3MCH, 0,9 mM NADPH) ermittelt.

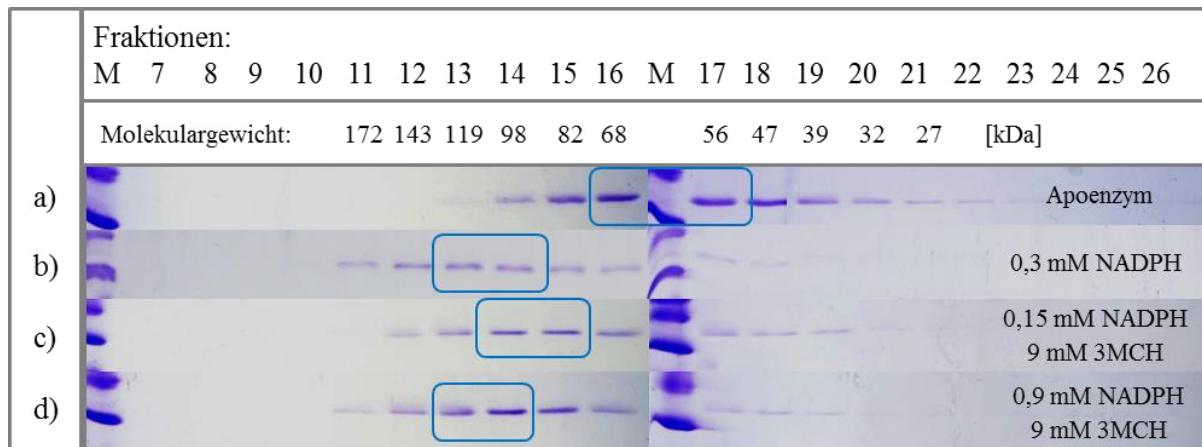


Abb. 3.12: Analyse der Gelfiltrationsläufe von At2g29350 mit SDS-PAGE. Enzymkonzentration: 0,9 mg/mL, 20 °C. Aufgetragen wurden die Proben der Fraktionen 7-26. Die Molekulargewichtsangaben entsprechen dem Mittel des Volumens der jeweiligen 2 mL-Fraktion, bestimmt über die Kalibriergerade. Blaue Kästen markieren die jeweiligen Elutionsmaxima. a) – d) Substrat- und Cosubstratkonzentrationen während der Gelfiltrationsläufe.

Wie At2g29350(S26A,A48D) zeigte das Wildtyp-Enzym als Apoenzym ein Elutionsmaximum, das einem Molekulargewicht von ca. 62 kDa und somit einem Dimer entspricht (Abb. 3.12a). Unter Cosubstratsättigung lag das Elutionsmaximum bei einem Molekulargewicht von ca. 108 kDa (Abb. 3.12b). Dasselbe Ergebnis wurde für die Messung unter gleichzeitiger Sättigung mit Substrat und Cosubstrat erhalten (Abb. 3.12d). Unter Substratsättigung wurde anhand des Elutionsvolumens ein Molekulargewicht von ca. 98 kDa detektiert (Abb. 3.12c). Somit zeigte sich auch für das Wildtyp-Enzym eine Abhängigkeit der Quartärstruktur von der Cosubstratkonzentration.

3.2 Änderung der Cosubstratpräferenz von At2g29350 durch die Bildung von Chimären

Die enzymkinetischen Messungen und die Bestimmung der nativen Quartärstruktur weisen darauf hin, dass At2g29350(S26A,A48D) cosubstratabhängig einer Strukturänderung unterliegt, die bei niedrigen Cosubstratkonzentrationen zu sehr geringen Umsatzgeschwindigkeiten führt. CoTR zeigte hingegen keine cosubstratabhängige Änderung der Quartärstruktur. Durch die Erzeugung von Chimären, die den N-terminalen Bereich von CoTR einschließlich der Cosubstratbindestelle mit dem C-terminalen Bereich von At2g29350 verbinden, sollte versucht werden, diese Strukturänderung in Richtung Tetramer zu forcieren. In die Chimären sollten nachfolgend die Mutationen in die Cosubstratbindestelle für die Bindung von NAD(H) eingeführt werden.

Geplant wurden zwei Chimären mit unterschiedlichen Anteilen an N-terminaler CoTR-Sequenz, orientiert an den Homologiemodellen (Fischer, 2015) von At2g29350 und CoTR. Für die Fusionsstellen wurden zwei Bereiche in den Sequenzen potenzieller Loop-Bereiche gewählt (Abb. 3.13). Die erste Chimäre (Chimäres Gen 1, CG1) wurde mit einem N-terminalen CoTR-Sequenzanteil von ca. 1/3 geplant und die Fusionsstelle befindet sich am Ende der Loop-Struktur hinter dem vierten β -Faltblatt (β D; Abb. 3.13). Dieser Sequenzaustausch beinhaltet zum einen die Substitution der beiden N-terminalen Loops in denen die basischen, für die NADPH-Bindung essentiellen Aminosäuren (K27/28 und R49/50; Abb. 3.13) lokalisiert sind und zum anderen die lange Loop-Struktur hinter dem vierten β -Faltblatt, welche sich in unmittelbarer Nähe zum Cosubstrat befinden. Die Fusionsstelle liegt zudem vor der katalytischen Tetrade und dem Substratbindebereich. Die zweite Chimäre (Chimäres Gen 2, CG2) wurde mit einem N-terminalen CoTR-Sequenzanteil von ca. 50% geplant, und die Schnittstelle befindet sich in der Loop-Struktur hinter dem fünften β -Faltblatt (β E; Abb. 3.13). Dieser Sequenzaustausch beinhaltet zusätzlich zu den ausgetauschten Bereichen von CG1 die lange Sequenz der vierten α -Helix α E sowie des fünften β -Faltblattes β E und einen Teil der nachfolgenden Loop-Strukturen. Der ausgetauschte Sequenzbereich aus der CoTR beinhaltet zudem das Asparagin und das Serin der katalytischen Tetrade (Abb. 3.13).

Die chimären Gene im Expressionsvektor pQE30 wurden wie in Abschnitt 2.2.3.2 beschrieben hergestellt und in *E. coli* M15 exprimiert. Die anschließende Reinigung über Metallionenaffinitätschromatographie lieferte die Chimären als lösliche Proteine in guter Ausbeute von 33-63 mg/L Medium und einer Reinheit >95% (Tab. 6.17 und Abb. 6.1b, Anhang). Die beiden Chimären wurden anschließend im Standardassay (5 mM 3MCH, 0,2 mM NAD(P)H)

3 Ergebnisse

auf ihre enzymatische Aktivität untersucht und die Produktbildung wurde mittels GCMS verifiziert (Abschnitt 2.2.8).

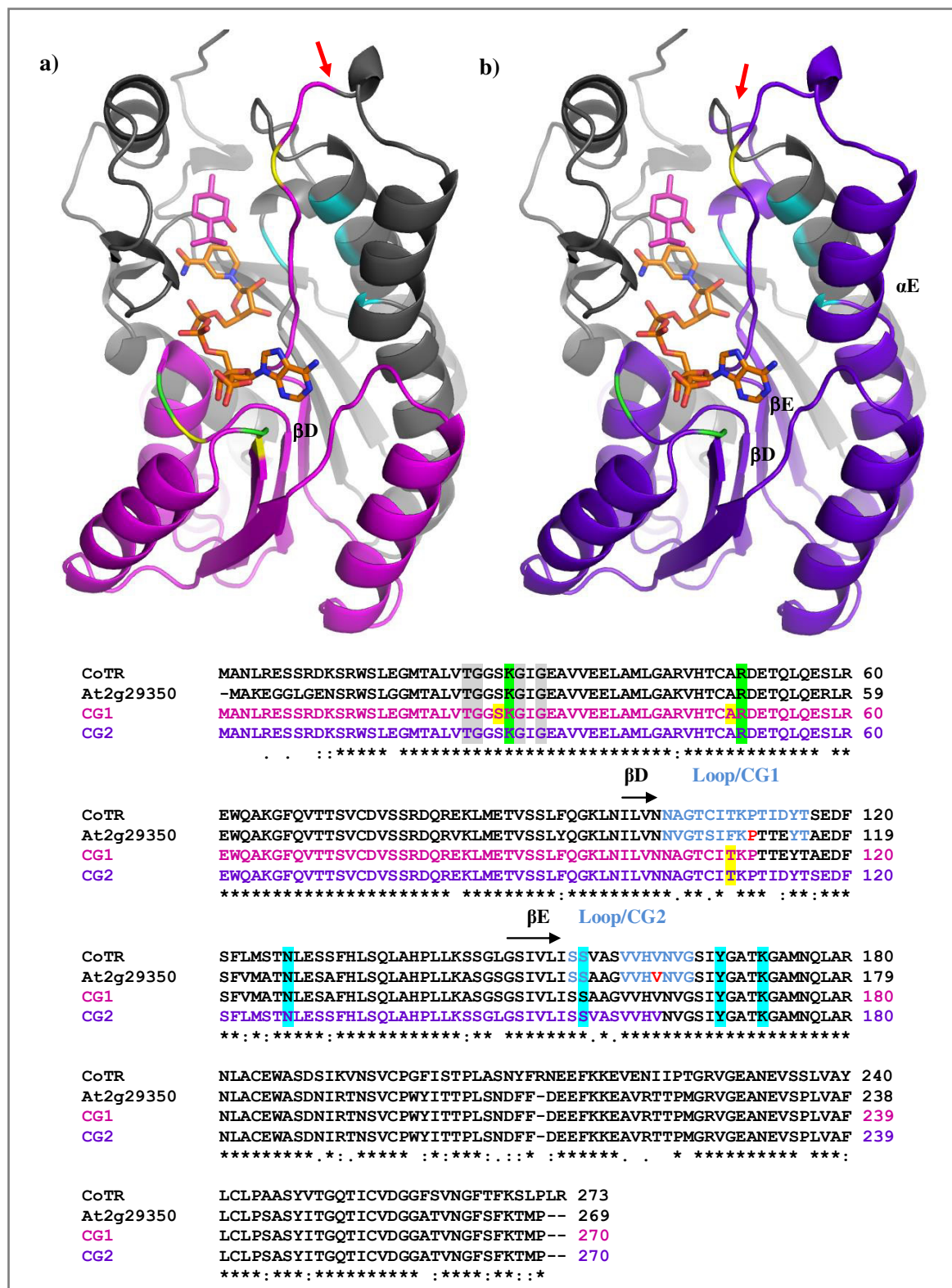


Abb. 3.13: Sequenzalignment von CoTR mit At2g29350 und den Chimären CG1 und CG2 sowie graphische Darstellung der Chimären unter Verwendung des Homologiemodells von At2g29350.

3 Ergebnisse

Zu Abb. 3.13: Alignment: farblich unterlegt: grau: Glycin-reiches Motiv; grün: basische Aminosäure für die Bindung von NADPH; hellblau: katalytische Tetrade; gelb: Positionen der zusätzliche Mutationsstellen S27A, A49D und T109F in den Chimären. Schrift farblich hervorgehoben: hellblau: Loop-Bereiche für die Schnittstellen C-terminal hinter den beiden β -Faltblättern β D und β E; rot: Aminosäuren, deren Codons mutiert wurden, um die benötigten Restriktionsschnittstellen einzufügen \rightarrow entspricht der Fusionsstelle in den Chimären; pink: CoTR-Anteil von CG1; violett: CoTR-Anteil von CG2. Graphische Darstellung: Bereiche, die durch die Sequenz der CoTR ausgetauscht wurden, sind farblich hervorgehoben. a) CG1: CoTR-Anteil pink, b) CG2: CoTR-Anteil violett. Grün: Positionen der basischen Aminosäuren zur NADPH-Bindung; hellblau: Positionen der katalytischen Tetrade; gelb: Positionen der Mutationen S27A, A49D und T109F. Rote Pfeile: Fusionsstelle in den Chimären. Orange: NADPH; rosa: Menthon im Bereich der Substratbindetasche. Homologiemodell, Fischer, 2015.

Sowohl CG1 als auch CG2 zeigten Enzymaktivität (Tab. 3.6), wobei für CG1 ein viel höherer Wert als für CG2 erhalten wurde. Beide chimären Proteine waren wie At2g29350 strikt NADPH-abhängig. Das Homologiemodell von At2g29350 weist darauf hin, dass die Aminosäure F109 an der Bildung der Substratbindetasche beteiligt ist (Abb. 3.13; Fischer, 2015). In den Chimären CG1 und CG2 war diese Sequenzposition durch ein Threonin aus der CoTR besetzt. In beiden Chimären wurde daraufhin das Threonin durch Phenylalanin ersetzt und die resultierenden Enzymvarianten auf Aktivität getestet. CG1(T109F) zeigte eine etwas höhere Aktivität als CG1, während CG2(T109F) eine geringere Aktivität aufwies als CG2 (Tab. 3.6).

Tab. 3.6: Aktivitätstest der Chimären CG1 und CG2 sowie ihrer Enzymvarianten. 5 mM 3MCH, 0,2 mM NAD(P)H, 30 °C. Photometrische Messung der Absorptionsänderung von NAD(P)H bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit vier technischen Replikaten (n = 4).

Chimäre/ Enzymvariante	spez. Aktivität [nkat/mg] (NADPH)			spez. Aktivität [nkat/mg] (NADH)		
	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
CG1	2,2 ± 0,3	38,8 ± 1,2	37,4 ± 1,6	-	-	-
CG1(T109F)	-	51,8 ± 1,3	30,5 ± 1,6	-	-	-
CG1(A49D,T109F)	-	-	-	-	-	-
CG1(S27A,A49D,T109F)	-	-	-	-	0,7 ± 0,1	2,0 ± 0,1
CG2	-	3,4 ± 0,1	2,0 ± 0,1	-	-	-
CG2(T109F)	-	0,9 ± 0,1	0,2 ± 0,0	-	-	-

Für CG1 wurde getestet, welche Auswirkung die beiden Mutationen A49D und S27A in Anlehnung an die analogen Varianten der Wildtyp-Enzyme (vergl. Abschnitt 3.1.1 und 3.1.2) haben. Auf Grund der höheren Aktivität wurde für die beiden Mutationen nicht CG1 sondern die Phenylalanin-Variante CG1(T109F) eingesetzt. Die resultierenden CG1(A49D,T109F) und CG1(S27A,A49D,T109F) zeigten in Bezug auf die beiden Mutationen ein ähnliches Verhalten wie At2g29350. Wird nur das Alanin durch das Aspartat ersetzt, so verliert das Protein seine Aktivität (Tab. 3.6). Durch den zusätzlichen Austausch des Serins zu einem Alanin wird ein strikt NADH-abhängiges Protein erhalten, jedoch mit einer sehr geringen spezifischen

3 Ergebnisse

Aktivität. Für die aktiven Chimären und Enzymvarianten wurde der Einfluss des pH-Wertes auf die Enzymaktivität untersucht (Abb. 6.3, Anhang). Die pH-Optima sind in Tabelle 3.7 aufgeführt. Wie für die Enzymvarianten von At2g29350 konnte ein Shift der pH-Optima in den neutralen Bereich im Vergleich zu den beiden Wildtyp-Enzymen (At2g29350: KPP pH 5,5; CoTR: CPP pH 5,0) beobachtet werden.

Tab. 3.7: pH-Optima und natives Molekulargewicht der Chimären und ihrer Enzymvarianten. pH-Wert (Reduktion): 5 mM 3MCH, 0,2 mM NAD(P)H, pH 4,5-9,0, 30 °C. Photometrische Messung der Absorptionsänderung von NAD(P)H bei 340 nm. Zwei Wiederholungen mit vier technischen Replikaten (n = 4). Analytische Ultrazentrifugation: M(app) = apparentes Molekulargewicht. 20 °C, 10.000 rpm; Einzelmessungen. k. A., keine Angaben.

Chimären und Varianten	pH-Wert (Puffer)	M(app) [kDa]	
		0,04 mg/mL	0,30 mg/mL
CG1	6,4 (KPP)	56	78
CG1(T109F)	6,0 (KPP)	k. A.	k. A.
CG1(S27A,A49D,T109F)	7,5 (KPP)	86	k. A.
CG2	6,4 (KPP)	k. A.	k. A.
CG2(T109F)	6,0 (KPP)	75	90

Da CoTR im Vergleich zu At2g29350 kein Dimer-Tetramer-Gleichgewicht aufwies, stellte sich bei den Chimären die Frage nach der Quartärstruktur. Zur Untersuchung des nativen Molekulargewichts wurden die beiden Chimären CG1 und CG2 sowie CG1(S27A,A49D,T109F) in der analytischen Ultrazentrifugation vermessen (Priv.-Doz. Dr. H. Lilie, MLU, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Technische Biochemie). Die Ergebnisse zeigten, dass sowohl CG1 und CG1(S27A,A49D,T109F) als auch CG2 in enzymkonzentrationsabhängigen Dimer-Tetramer-Gleichgewichten vorliegen (Tab. 3.7). Um zu untersuchen, wie sich die Chimären in Abhängigkeit von verschiedenen Substrat- und Cosubstratkonzentrationen verhalten, wurde exemplarisch für CG1, CG1(S27A,A49D,T109F) und CG2 die spezifische Aktivität bei unterschiedlichen Substrat- und Cosubstratkonzentrationen ermittelt (Abb. 3.14). Es zeigte sich, dass sich die spezifische Aktivität durch die Erhöhung von Substrat- und Cosubstratkonzentration stetig steigern lässt und so unter den gewählten Bedingungen keine Sättigung erreicht wird, mit Ausnahme der Messung von CG1 und CG2 mit verschiedenen 3MCH-Konzentrationen (Abb. 3.14b und f), wobei die Höhe der spezifischen Aktivität jedoch stark von der Cosubstratkonzentration abhängt.

3 Ergebnisse

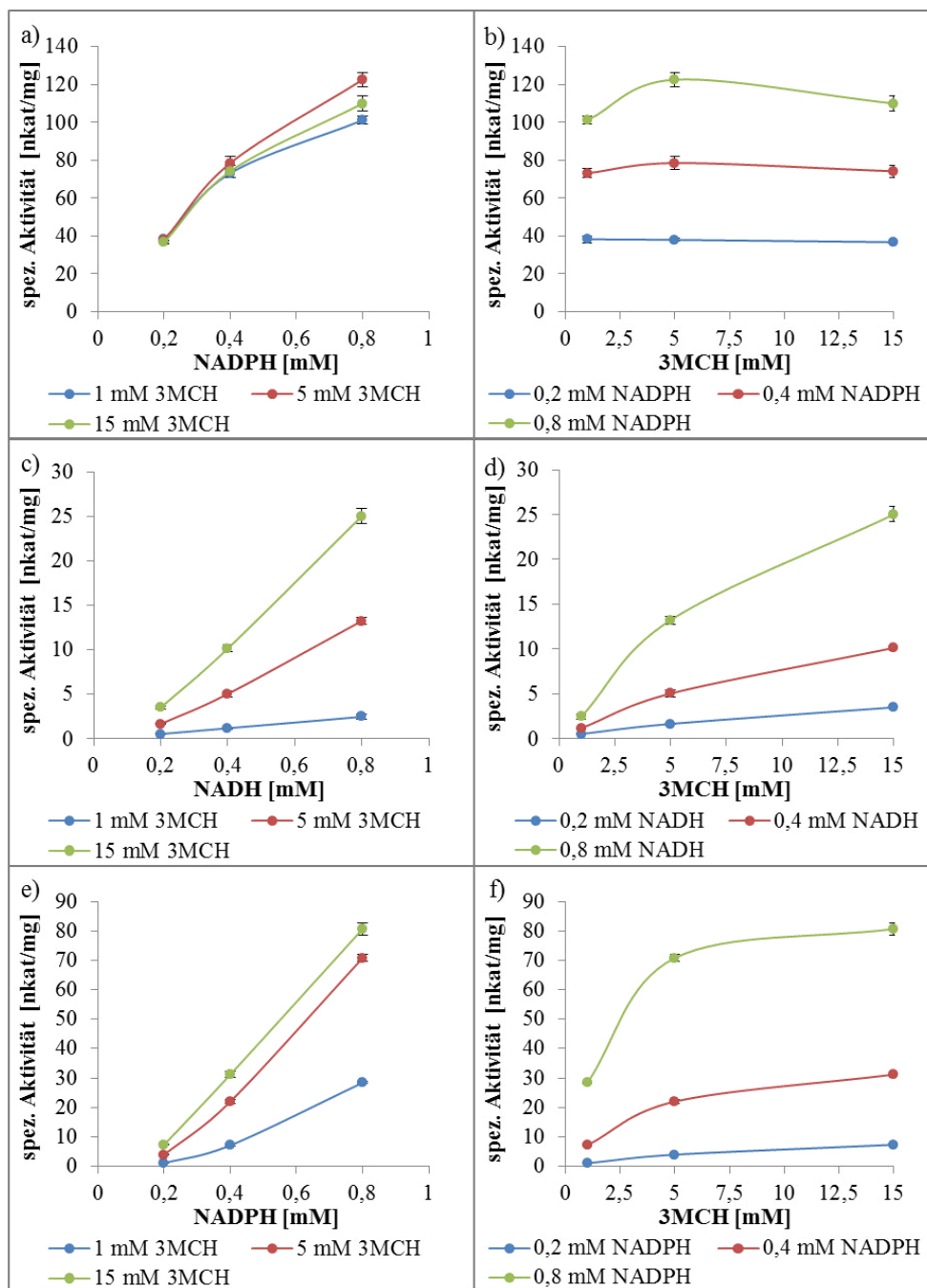


Abb. 3.14: Messungen der spezifischen Aktivität von CG1 (a, b), CG1(S27A,A49D,T109F) (c, d) und CG2 (e, f) in Abhängigkeit von Cosubstrat- und Substratkonzentration. Abhängigkeit von der Cosubstratkonzentration (a, c, e) bei verschiedenen Substratkonzentrationen und von der Substratkonzentration (b, d, f) bei verschiedenen Cosubstratkonzentrationen. Die Messungen erfolgten bei 30 °C bei den pH-Optima der Proteine. Photometrische Messung der Absorptionsänderung von NAD(P)H bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit vier technischen Replikaten (n = 4).

Die Chimären gleichen folglich in ihrer Quartärstruktur und ihrem kinetischen Verhalten den At2g29350-Varianten. Somit konnte in den Chimären und den von ihnen abgeleiteten Enzymvarianten keine Verbesserung der Eigenschaften gegenüber der mit NADH aktiven At2g29350(S26A,A48D) festgestellt werden.

3.3 Identifizierung anwendungsrelevanter Substrate

3.3.1 Ermittlung anwendungsrelevanter Substrate anhand des Pharmacophoren-Screenings

Bei der Suche nach anwendungsrelevanten Substraten für At2g29350 und CoTR wurde das Pharmacophoren-Screening basierend auf dem Homologiemodell von At2g29350 (Fischer, 2015) erneut ausgewertet. Das Screening umfasste 1532 Strukturen und die Beurteilung der Anwendungsrelevanz erfolgte unter Zuhilfenahme der Scifinder-Datenbank (www.cas.org/products/scifinder). Ein vielversprechendes Ergebnis stellte die pharmacophore Struktur 1341 dar (Abb. 3.15).

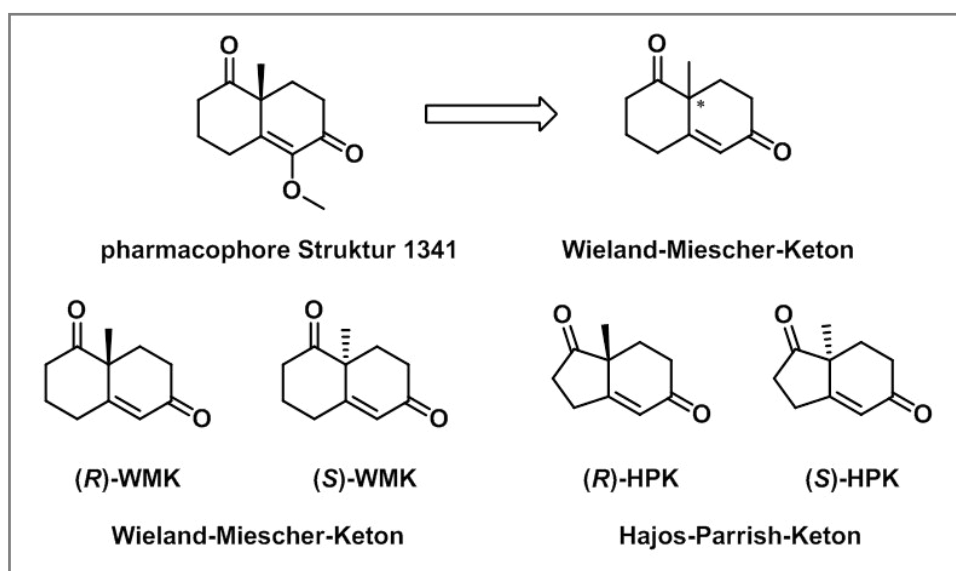


Abb. 3.15: Pharmacophore Struktur 1341 und Struktur des Wieland-Miescher-Ketons (WMK) sowie die Enantiomere des Wieland-Miescher- und des Hajos-Parrish-Ketons (HPK).

Bei dieser Struktur handelt es sich abgesehen von der Methoxygruppe um die Struktur des Wieland-Miescher-Ketons (WMK; Wieland et al., 1950; Hajos et al., 1974; Eder et al., 1971). WMK stellt als Startbaustein für die chemische Totalsynthese von polyzyklischen Terpenen und Steroiden (u.a. Ihara et al. 1986; Bruner et al. 1995; Ma et al. 2010) eine wichtige Verbindung dar. Neben WMK ist zudem das strukturell verwandte Hajos-Parrish-Keton (HPK, Hajos et al., 1974; Eder et al., 1971), welches im Vergleich zum WMK aus einem Sechs- und einem Fünfring statt aus zwei annelierten Sechsringen besteht, von ähnlicher Bedeutung in der chemischen Synthese (u.a. Micheli et al., 1974; Brady et al., 2005). Die vier Enantiomere der beiden Diketone WMK und HPK stellen im Folgenden die Basis für die Untersuchung der Substratspezifität der TRL und von CoTR dar (Abb. 3.15).

3 Ergebnisse

3.3.2 Bicyklische Diketone als Substrate

In Testassays wurden die Enzyme At2g29350, At2g29360, At2g29330 und CoTR sowie At2g29350(S26A,A48D), At2g29360(S27A,A49D), CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) auf Aktivität gegenüber den Diketonen getestet (Tab. 3.8).

Tab. 3.8: Aktivität der Tropinonreduktase-ähnlichen Enzyme, von CoTR und ihrer mit NADH aktiven Enzymvarianten gegenüber den Enantiomeren des Wieland-Miescher- und Hajos-Parrish-Ketons. 5 mM Substrat (Ausnahme At2g29350(S26A,A48D) und At2g29360(S27A,A49D): 10 mM), 0,2-0,4 μ M NAD(P)H. Messung bei 30 °C und den pH-Optima der Proteine. Photometrische Messung der Absorptionsänderung von NAD(P)H bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit vier technischen Replikaten (n = 4).

Enzym/Variante	spez. Aktivität [nkat/mg]			
	(R)-WMK	(S)-WMK	(R)-HPK	(S)-HPK
At2g29350	1,1 \pm 0,7	48,9 \pm 1,4	2,4 \pm 0,8	15,6 \pm 2,6
CoTR	3,8 \pm 0,8	6,1 \pm 0,3	1,8 \pm 0,5	-
At2g29360	0,8 \pm 0,2	1,1 \pm 0,1	-	-
At2g29330	0,7 \pm 0,1	-	-	-
At2g29350(S26A,A48D)	-	20,6 \pm 0,7	-	7,0 \pm 0,7
CoTR(A49D)	21,0 \pm 1,4	9,7 \pm 0,6	4,0 \pm 0,8	-
CoTR(S27A,A49D)	24,3 \pm 0,6	13,3 \pm 0,9	6,6 \pm 0,7	-
At2g29360(S27A,A49D)	-	-	-	-

Die Ergebnisse zeigten, dass die beiden bicyklischen Diketone von At2g29350 und CoTR als Substrate akzeptiert wurden. At2g29330 und At2g29360 wiesen keine Aktivität mit HPK auf. Gegenüber WMK zeigte At2g29360 eine Restaktivität für beide Enantiomere, wogegen At2g29330 nur gegenüber des (R)-Enantiomers eine Restaktivität aufwies. Auffällig war zudem, dass At2g29350 eine 44,5-fach (WMK) bzw. 6,5-fach (HPK) erhöhte Aktivität gegenüber den (S)-Enantiomeren besitzt. Für (R)-WMK und (R)-HPK wurden nur Restaktivitäten von 1,1 nkat/mg bzw. 2,4 nkat/mg erhalten. Diese Tendenz korreliert mit den Daten für At2g29350(S26A,A48D), da diese auch nur Aktivität gegenüber den (S)-Enantiomeren zeigte. Für CoTR und ihre beiden Varianten war nur gegenüber dem (R)-Enantiomer von HPK eine Aktivität messbar, während beide Enantiomere von WMK umgesetzt wurden. At2g29360-(S27A,A49D) zeigte dagegen keine Aktivität gegenüber den Diketonen. Auf Grund dieser Ergebnisse wurden für die weiteren Untersuchungen nur die beiden Enzyme At2g29350 und CoTR sowie ihre Enzymvarianten und chimären Proteine verwendet.

3.3.3 Analytik der Produktbildung der biokatalytischen Umsetzung der Diketone

3.3.3.1 Mögliche Produktbildung durch die Enzyme

Bei der biokatalytischen Reduktion von WMK und HPK kann theoretisch sowohl die Carbonylgruppe an C5 als auch die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe an C1 vom Enzym zum Alkohol reduziert werden (Abb. 3.16). Die dabei gebildeten α,β -gesättigten oder α,β -ungesättigten Hydroxyketone sind auf Grund der jeweils zweiten Carbonylgruppe zudem ebenfalls potenzielle Substrate für die Enzyme und könnten zu Diolen weiter reduziert werden.

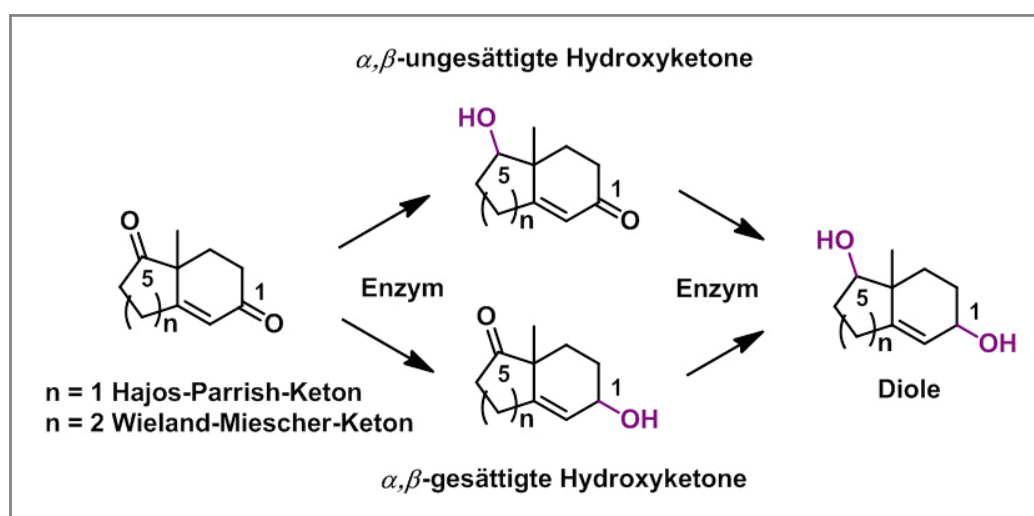


Abb. 3.16: Mögliche Produktbildung durch die biokatalytische Reduktion des Wieland-Miescher- bzw. Hajos-Parrish-Ketons. Nummerierung des Kohlenstoffgrundgerüsts unabhängig von der IUPAC-Nomenklatur.

Werden die enantiomerenreinen Diketone eingesetzt, sind ausgehend von einem Enantiomer auf Grund der Prochiralität der Carbonylgruppen insgesamt acht Produkte denkbar. In Abbildung 3.17 sind die möglichen Produkte ausgehend von entweder dem (*S*)- oder dem (*R*)-Enantiomer der Diketone dargestellt. Für eine bessere Übersichtlichkeit erfolgt die Nummerierung des Kohlenstoffgrundgerüsts der Verbindungen unabhängig von der IUPAC-Nomenklatur (Abschnitt 2.2.7.3). Evident ist, dass für beide Diketone die Produkte ausgehend von dem (*S*)-Enantiomer die Enantiomere der Produkte ausgehend von dem (*R*)-Enantiomer darstellen. Da als Ausgangsstoffe für die enzymatischen Reaktionen die enantiomerenreinen Diketone verwendet wurden, konnte für die benötigte Analytik der biokatalytischen Produktbildung eine nicht chirale GCMS-Methode eingesetzt werden. Dieses erleichterte die Herstellung der Referenzsubstanzen, da so nur ausgehend von jeweils einem Diketon-Enantiomer die Referenzen hergestellt werden mussten, da die Produkte dieselben Retentionszeiten und Massen-Fragmentierungsmustern aufweisen, wie die Produkte ausgehend vom anderen Enantiomer. Die Synthese der Referenzsubstanzen erfolgte ausgehend von den (*S*)-Enantiomeren von

3 Ergebnisse

WMK und HPK. Die α,β -ungesättigten ($4R,5R$)-Hydroxyketone wurden zusätzlich ausgehend von den (R)-Enantiomeren der Diketone hergestellt, da sie für die spätere Charakterisierung der Rückreaktion benötigt wurden.

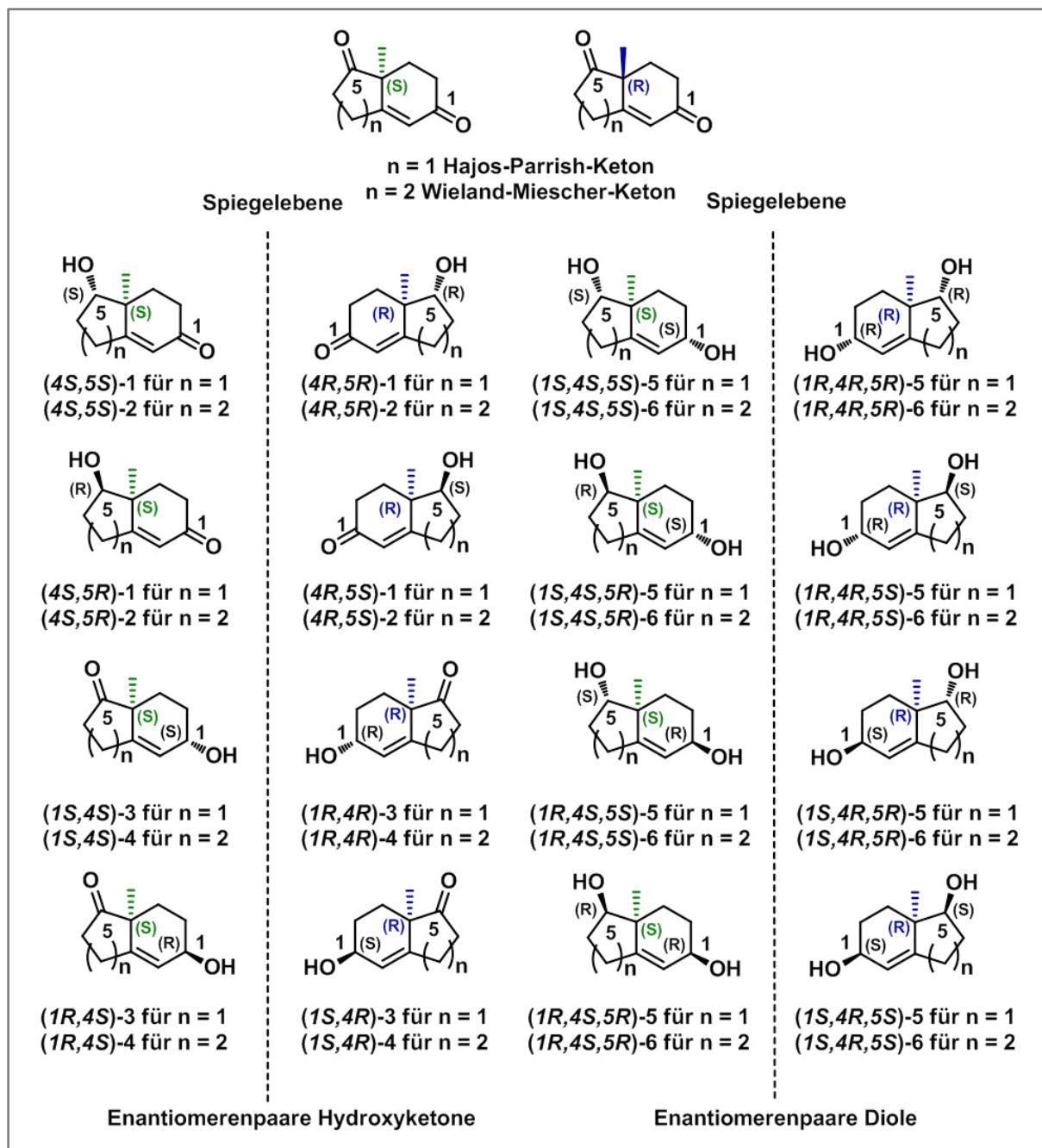


Abb. 3.17: Gegenüberstellung der Enantiomerenpaare der möglichen Reduktionsprodukte (Hydroxyketone und Diole) ausgehend von den enantiomerenreinen Wieland-Miescher- und Hajos-Parrish-Ketonen. Nummerierung des Kohlenstoffgrundgerüsts unabhängig von der IUPAC-Nomenklatur.

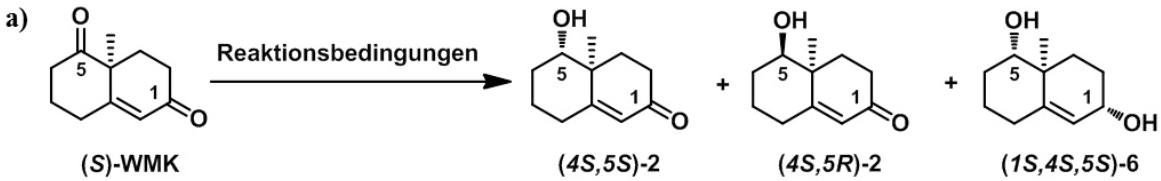
3.3.3.2 Chemische Synthese der Referenzsubstanzen

Die Herstellung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone ausgehend vom WMK erfolgte mittels Reduktion mit Natriumborhydrid (Tab. 3.9; Lu et al., 2011; Yang et al., 2002).

3 Ergebnisse

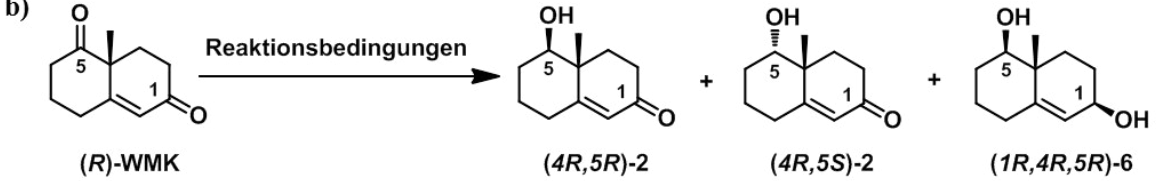
Tab. 3.9: Bedingungen, Ausbeute und Produktverhältnis der Reduktion des Wieland-Miescher-Ketons mit NaBH₄. a) ausgehend von (*S*)-WMK; b) ausgehend von (*R*)-WMK.

a)



Reaktionsbedingungen	Ausbeute	Produktverhältnis		
		(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2	(4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2	(1 <i>S</i> ,4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-6
NaBH ₄ (0,35 Äq.), EtOH, 0 °C, 30 min	> 99%	92%	2%	6%
NaBH ₄ (0,3 Äq.), EtOH, -10 bis -15 °C, 40 min	> 99%	95%	3%	2%

b)



Reaktionsbedingungen	Ausbeute	Produktverhältnis		
		(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-2	(1 <i>R</i> ,4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-6
NaBH ₄ (0,35 Äq.), EtOH, 0 °C, 30 min	> 99%	89%	2%	9%
NaBH ₄ (0,3 Äq.), EtOH, -10 bis -15 °C, 40 min	> 99%	95%	2%	3%

Die Reaktion wurde durch die in den Diketonen befindliche Methylgruppe kontrolliert und lieferte somit für die Enantiomere von WMK (*4S,5S*)-2 bzw. (*4R,5R*)-2 als Hauptprodukt (Tab. 3.9a und b). Als Nebenprodukte entstanden, wie später nachgewiesen werden konnte, zum einen die Diastereomere der α,β -ungesättigten Hydroxyketone (*4S,5R*)-2 und (*4R,5S*)-2 sowie die Dirole (*1S,4S,5S*)-6 bzw. (*1R,4R,5R*)-6. Die Bildung der Dirole konnte durch eine Verringerung der Äquivalente an NaBH₄ und tiefere Temperaturen reduziert werden. Die Produktverhältnisse wurden anhand der Signale der olefinischen Protonen (10-H) in den ¹H-NMR-Spektren ermittelt.

Für die Darstellung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone (*4S,5S*)-1 und (*4R,5R*)-1 ausgehend von den Enantiomeren von HPK wurden durch die Reduktion mit Natriumborhydrid nur die gewünschten Hydroxyketone erhalten (Abb. 3.18; Yang et al., 2002).

3 Ergebnisse

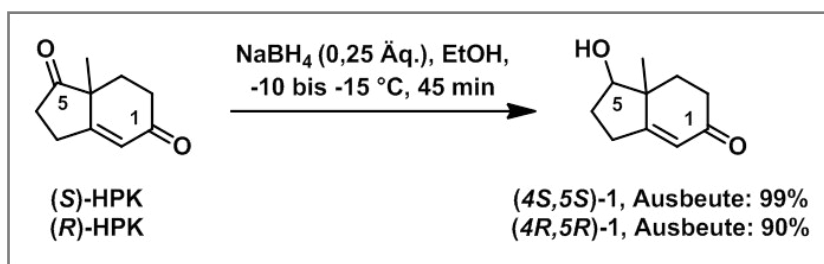


Abb. 3.18: Herstellung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone (4S,5S)-1 und (4R,5R)-1 ausgehend vom (S)- und (R)-Hajos-Parrish-Keton.

Da Natriumborhydrid die α,β -ungesättigten Carbonylgruppe nur schwach oder gar nicht reduziert, wurde für die Synthese der α,β -gesättigten Hydroxyketone Lithiumaluminiumhydrid verwendet (in Anlehnung an Corbu et al., 2007). Da dieses jedoch auch die Carbonylgruppe an C5 reduzieren würde, musste diese zuvor geschützt werden (Abb. 3.19).

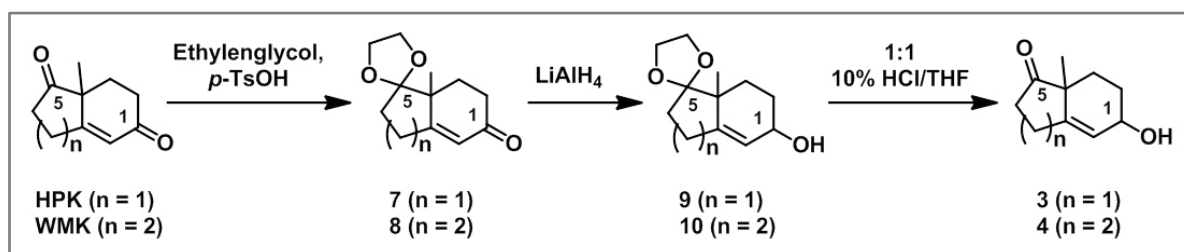


Abb. 3.19: Reaktionsfolge zur Herstellung der α,β -gesättigten Hydroxyketone ausgehend vom Hajos-Parrish- und Wieland-Mischer-Keton.

Die Schützung der Carbonylgruppe sollte mittels Acetalbildung mit Ethylenglycol und *para*-Toluolsulfonsäure (*p*-TsOH) erfolgen (Ciceri et al., 1997). Diese Schutzgruppe ist zum einen stabil gegenüber dem basischen Reduktionsmittel und zum anderen lässt sie sich nach der Reduktion wieder einfach mit Salzsäure entfernen (in Anlehnung an Corbu et al., 2007). Die (S)-Enantiomere der beiden Diketone konnten in guten Ausbeuten geschützt werden (Abb. 3.20).

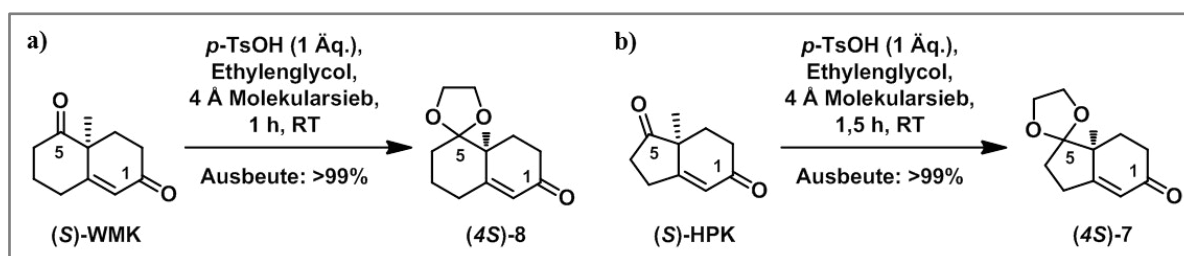


Abb. 3.20: Acetal-Schützung der (S)-Enantiomere des Wieland-Miescher- (a) und Hajos-Parrish-Ketons (b).

3 Ergebnisse

Bei der anschließenden Reduktion der geschützten Diketone mit LiAlH_4 (in Anlehnung an Corbu et al., 2007), wurden ausgehend von dem geschützten WMK (4*S*)-8 ein Haupt- und ein Nebenprodukt erhalten, welche säulenchromatographisch getrennt werden konnten. Trotz der Reinigung über Kieselgel konnte das Nebenprodukt (NP) nur in geringer Reinheit (undefinierte Nebenprodukte im CH_2 -Bereich der NMR-Spektren) erhalten werden. HRMS- und GCMS-Messungen zeigten, dass es sich bei HP (4*S*)-10 und NP (4*S*)-10 um die beiden möglichen reduzierten Diastereomere handelte. Das Hauptprodukt (HP) konnte zudem vollständig mittels NMR analysiert werden. Die Reaktionsbedingungen sowie die Ausbeute des Hauptproduktes sind in Abbildung 3.21a wiedergegeben.

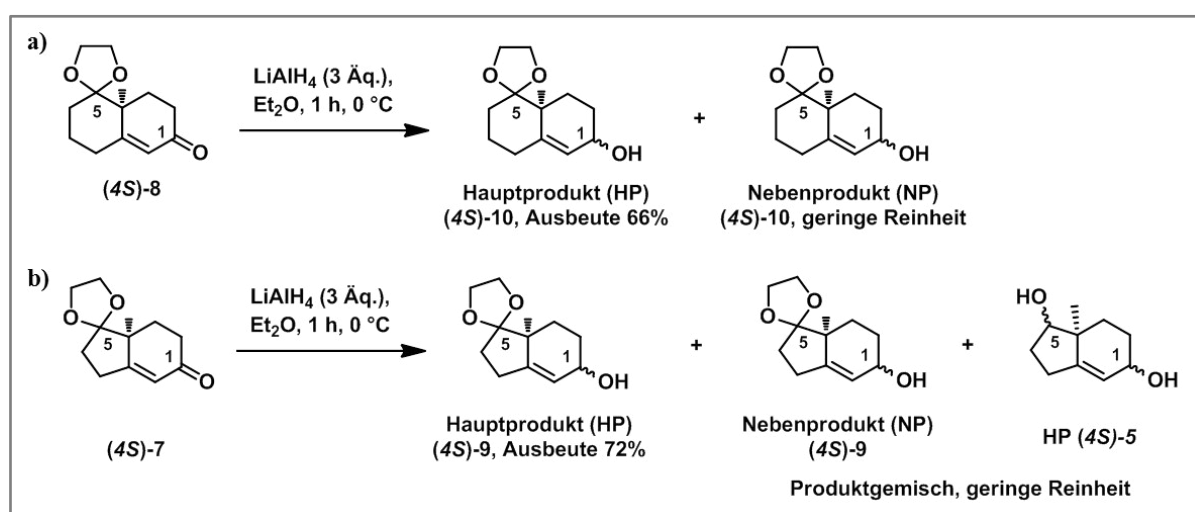


Abb. 3.21: Reduktion der geschützten (*S*)-Enantiomere des Wieland-Miescher- (a) und Hajos-Parrish-Ketons (b) mit LiAlH_4 .

Bei der Reduktion des geschützten HPK (4*S*)-7 konnten über Dünnschichtchromatographie sowohl bei der Kontrolle der Reaktion als auch während der Reinigung über Kieselgel wie bei der Reduktion von (4*S*)-8 ein Haupt- und ein Nebenprodukt detektiert werden. Die anschließende Analyse (NMR, GCMS, HRMS) der beiden Produkte zeigte, dass das Hauptprodukt eins der möglichen reduzierten Diastereomere (HP (4*S*)-9) war, es sich bei dem Nebenprodukt jedoch um ein Produktgemisch handelte. Das Produktgemisch bestand aus dem anderen möglichen reduzierten Diastereomer (NP (4*S*)-9) und wie sich später zeigte aus dem Diol HP (4*S*)-5. Da die reine Verbindung (4*S*)-7 für die Reaktion eingesetzt wurde, muss es folglich während der Reduktion zur teilweisen Entschützung der Ausgangsverbindung oder der reduzierten Produkte HP (4*S*)-9 oder NP (4*S*)-9 gekommen sein. Die Reaktionsbedingungen und die Ausbeute für das Hauptprodukt sind in Abbildung 3.21b gezeigt. Die Ausbeute für das Produktgemisch kann auf Grund einer geringen Reinheit (weitere undefinierte Nebenprodukte im CH_2 -Bereich der NMR-Spektren) nicht angegeben werden.

3 Ergebnisse

Das jeweilige Hauptprodukt wurde dann in einem 1:1-Gemisch aus 10% HCl und THF entschützt (in Anlehnung an Corbu et al., 2007). Die Dünnschichtchromatographie zur Kontrolle der Reaktion und der säulenchromatographischen Reinigung ließ vermuten, dass jeweils nur eine Verbindung gebildet wurde, jedoch zeigte die Produktanalyse (GCMS und NMR), dass es sich um Produktgemische der beiden möglichen Diastereomere der α,β -gesättigten Hydroxyketone (Produkt 1, P1 und Produkt 2, P2) handelte (Abb. 3.22).

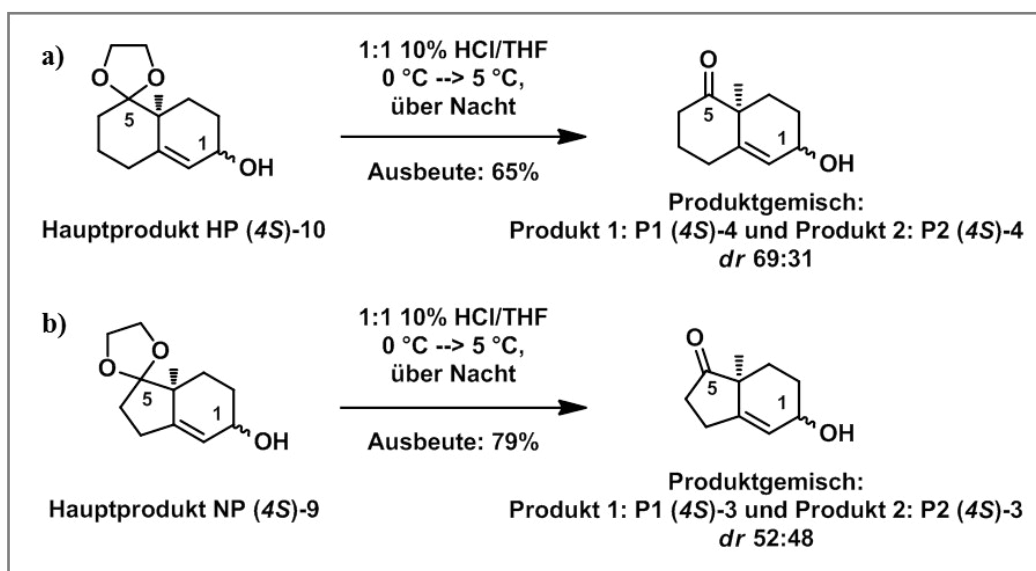


Abb. 3.22: Entsch\u00fctzung des reduzierten Wieland-Miescher- (a) und Hajos-Parrish-Ketons (b).

F\u00fcr die α,β -ges\u00e4ttigten Hydroxyketone von WMK wurde ein Diastereomeren-Verh\u00e4ltnis von 69:31 und f\u00fcr die α,β -ges\u00e4ttigten Hydroxyketone von HPK von 52:48 erhalten (Abb. 3.22a und b). Die Produktverh\u00e4ltnisse wurden anhand der Signale der olefinischen Protonen (10-H/MWK, und 9-H/HPK) in den ^1H -NMR-Spektren ermittelt. Der Erhalt der Produktgemische w\u00e4hrend der Entsch\u00fctzung, ausgehend von einer diastereomerenreinen Verbindung, kann durch eine s\u00e4urekatalysierte Isomerisierung der allylischen Alkoholgruppen erkl\u00e4rt werden.

Die Herstellung der Diole erfolgte durch die Reduktion der ungesch\u00fctzten Diketone mit Lithiumaluminiumhydrid (Harada et al., 1990). Da die Reduktion der Carbonylgruppe an C5 von WMK wie mit NaBH_4 substratgesteuert abl\u00e4uft, wurden jeweils nur zwei der vier Diole erhalten. Die beiden Diole konnten mittels S\u00e4ulenchromatographie getrennt werden und ihre Stereochemie \u00fcber die NMR-Spektren im Vergleich mit den NMR-Daten aus der Arbeit von N. HARADA (1990) zugeordnet werden. Das Nebenprodukt zeigte, wie bei der Reduktion der gesch\u00fctzten Diketone, eine geringe Reinheit (undefinierte Nebenprodukte im CH_2 -Bereich der NMR-Spektren), sodass nur f\u00fcr das Hauptprodukt die Ausbeute (84%) angegeben werden kann (Abb. 3.23a).

3 Ergebnisse

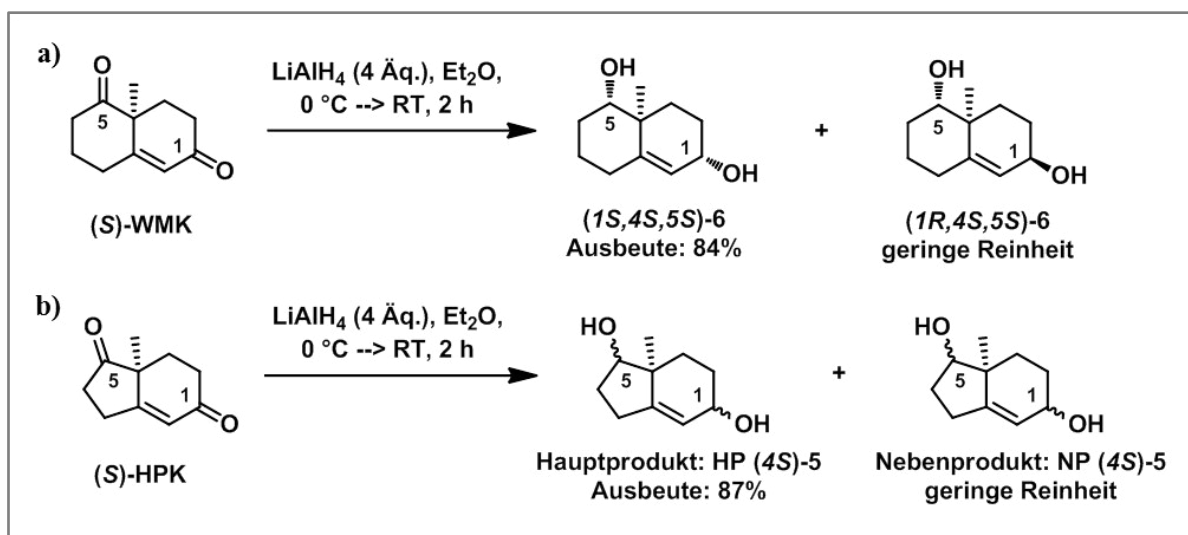


Abb. 3.23: Darstellung der Diole ausgehend von den (S)-Enantiomeren des Wieland-Miescher- (a) und Hajos-Parrish-Ketons (b).

HPK wurde mit LiAlH_4 unter denselben Bedingungen wie WMK reduziert. Es wurden ebenfalls ein Haupt- und ein Nebenprodukt erhalten, die säulenchromatographisch getrennt und mittels HRMS, GCMS und im Fall des Hauptproduktes mit NMR vollständig analysiert werden konnten. Das Nebenprodukt wurde auch für HPK nur in geringer Reinheit (undefinierte Nebenprodukte im CH_2 -Bereich der NMR-Spektren) erhalten, weshalb die Ausbeute nur für das Hauptprodukt (87%) angegeben wird (Abb. 3.23b).

3.3.3.3 Biokatalytische Herstellung der diastereomeren α,β -ungesättigten Hydroxyketone

Da von den α,β -ungesättigten Hydroxyketonen jeweils nur die (4S,5S)- bzw. (4R,5R)-Produkte synthetisch zugänglich waren, jedoch nicht ihre (4S,5R)- bzw. (4R,5S)-Diastereomere, wurden zusätzlich zu den chemischen Reaktionen auch biokatalytische Ansätze mit den beiden Wildtyp-Enzymen durchgeführt. Neben der Synthese der Referenzen sollten die Ansätze dazu dienen, erste Einblicke in die Produktbildung von At2g29350 und CoTR zu erhalten. Für die beiden Wildtyp-Enzyme wurden die Ansätze entsprechend der Enantiomeren-Akzeptanz in den Testassays (Abschnitt 3.3.2, Tab. 3.8) gewählt. Die biokatalytischen Reaktionen wurden wie die chemischen Reaktionen extrahiert, säulenchromatographisch gereinigt und anschließend über NMR und GCMS vermessen. Die Bestimmung der Produktreinheit und der Diastereomeren-Verhältnisse erfolgte erneut über die olefinischen Protonen (10-H/MWK und 9-H/HPK) in den ^1H -NMR-Spektren. Die Ansätze und Ergebnisse für At2g29350 sind in Abbildung 3.24 zusammengefasst.

3 Ergebnisse

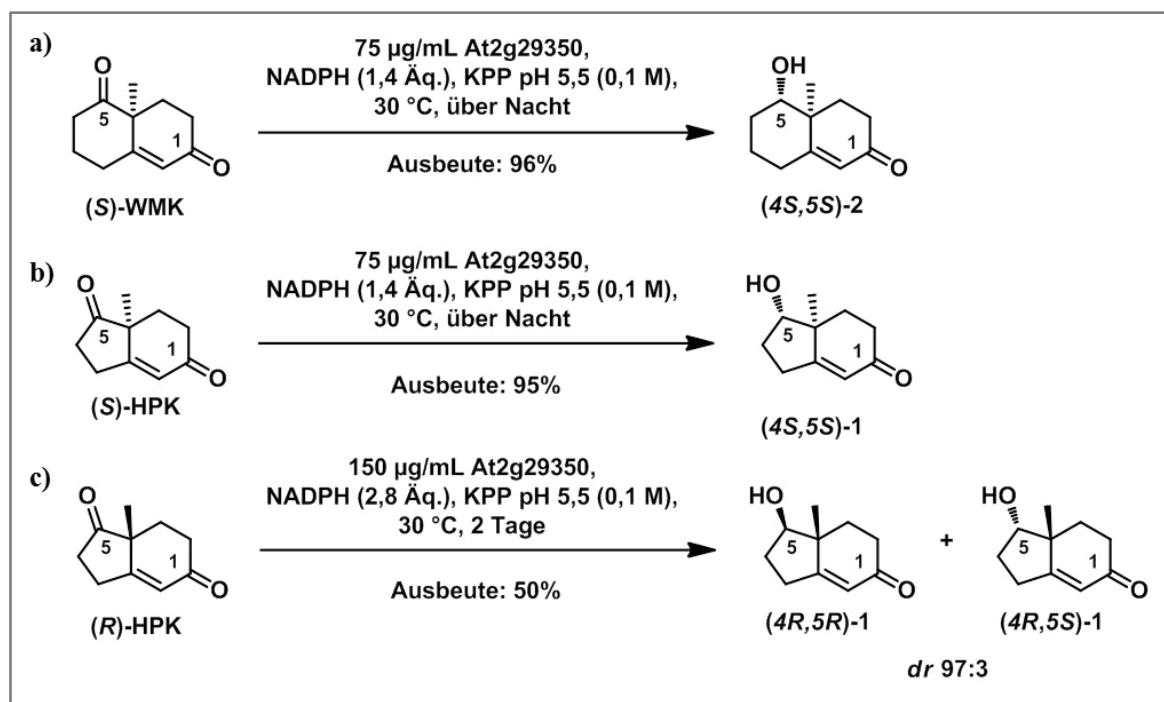


Abb. 3.24: Biokatalytische Umsetzung des (S)-Wieland-Mischer- (a), (S)-Hajos-Parrish- (b) und (R)-Hajos-Parrish-Ketons (c) durch At2g29350.

Die NMR-Messungen zeigten, dass At2g29350 f\u00fcr die (S)-Enantiomere der Diketone regioselektiv und stereospezifisch nur die α,β -unges\u00e4ttigten Hydroxyketone (4S,5S)-2 und (4S,5S)-1 entsprechend der Reduktion mit NaBH_4 bildet. Dagegen wurde ausgehend von dem (R)-Enantiomer von HPK zus\u00e4tzlich zu dem α,β -unges\u00e4ttigten Hydroxyketon (4R,5R)-1 das entsprechende Diastereomer (4R,5S)-1 in geringer Menge erhalten (*dr* 97:3).

Die Ergebnisse f\u00fcr CoTR sind in Abbildung 3.25 dargestellt. F\u00fcr die Umsetzung mit den (R)-Enantiomeren der Diketone zeigte CoTR eine Regioselektivit\u00e4t f\u00fcr die Reduktion der Carbonylgruppe an C5. Jedoch wurden neben den α,β -unges\u00e4ttigten Hydroxyketonen (4R,5R)-2 und (4R,5R)-1 als Hauptprodukte auch die diastereomeren Produkte (4R,5S)-2 und (4R,5S)-1 gebildet. Somit war CoTR im Vergleich zu At2g29350 mit den (S)-Enantiomeren nicht stereospezifisch in Bezug auf die Reduktion der Carbonylgruppe an C5 der (R)-Enantiomere, bevorzugte aber deutlich die Bildung der (4R,5R)-Produkte. Bei der Reduktion von (S)-WMK entstand als Hauptprodukt (4S,5S)-2. Als Nebenprodukte wurden zudem das Diastereomer (4S,5R)-2 und das Diol (1S,4S,5S)-6 erhalten.

Aufgrund der mangelnden Stereospezifit\u00e4t von CoTR wurden die Referenzen der α,β -unges\u00e4ttigten Hydroxyketone (4R,5S)-2, (4S,5R)-2 und (4R,5S)-1 erhalten. Nach Optimierung der GCMS-Methoden konnten die Wildtyp-Enzyme, die chim\u00e4ren Enzyme und ausgesuchte Enzymvarianten auf ihre Produktbildung mit den Diketonen untersucht werden. Im Retenti-

3 Ergebnisse

onsbereich der Diole wurde auf Grund der fehlenden Referenzen (vergl. Abb. 3.23) zudem auf weitere Peaks mit ähnlichen Fragmentierungsmuster entsprechend der vorliegenden Referenzen (*1S,4S,5S*)-6, (*1R,4S,5S*)-6, HP (*4S*)-5 und NP (*4S*)-5 geachtet.

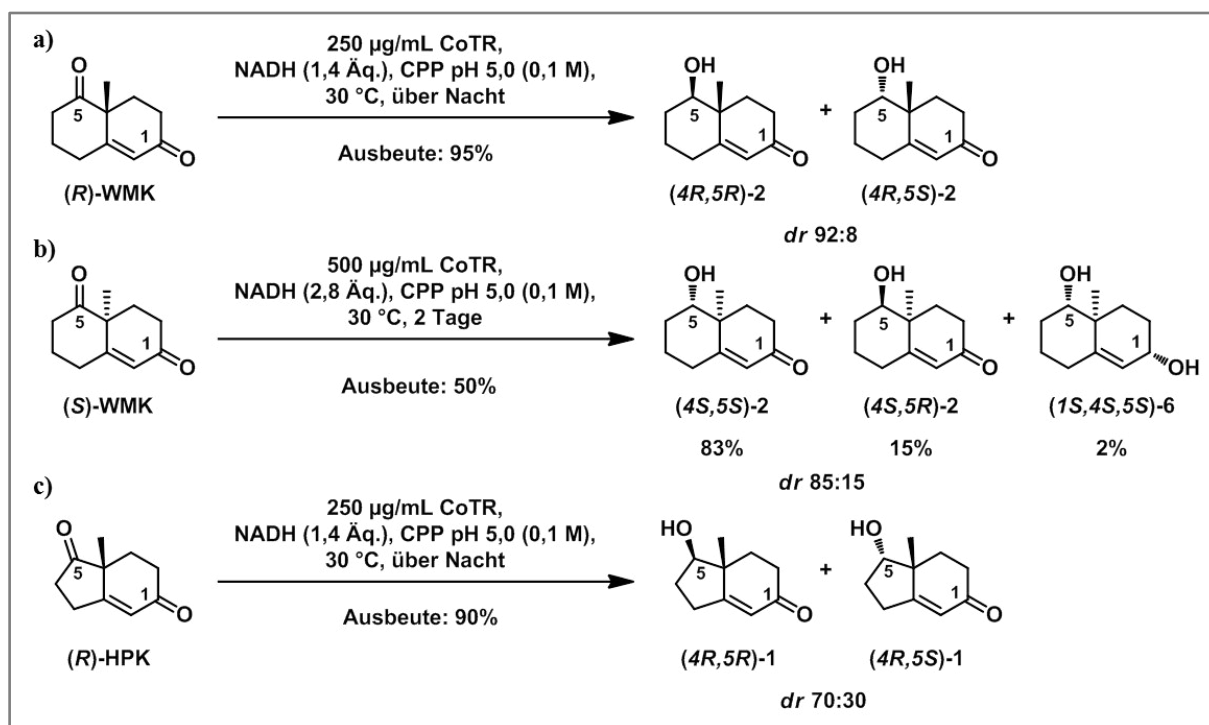


Abb. 3.25: Biokatalytische Umsetzung des (*R*)-Wieland-Miescher- (a), (*S*)-Wieland-Miescher- (b) und (*R*)-Hajos-Parrish-Ketons (c) durch CoTR.

3.3.3.4 Produktbildung aus der biokatalytischen Reduktion der bicyclischen Diketone

Die Produktbildung aus der biokatalytischen Umsetzung der Diketone wurde sowohl qualitativ (Tab. 3.10 und 3.11) als auch semiquantitativ (Abb. 3.26-3.29) mit GCMS ausgewertet. In Tabelle 3.10 ist die qualitative Produktbildung f\u00fcr die Umsetzung der Enantiomere von WMK aufgef\u00fchrt und in Abbildung 3.26 die semiquantitative Auswertung der Bildung der α,β -unges\u00e4tigten Hydroxyketone.

F\u00fcr das Wildtyp-Enzym At2g29350 wurde f\u00fcr beide Enantiomere nur die Bildung des (*4S,5S*)- bzw. (*4R,5R*)- α,β -unges\u00e4tigten Hydroxyketons detektiert. Dieses Ergebnis deckt sich ausgehend vom (*S*)-Enantiomer mit der Produktbildung im 20 mg-Ma\u00dfstab (Abschnitt 3.3.3.3). F\u00fcr die beiden Enzymvarianten At2g29350(S26A,A48D) und At2g29350(V103A) wurde ausgehend von den Enantiomeren von WMK ebenfalls nur die Bildung von (*4S,5S*)-2 bzw. (*4R,5R*)-2 beobachtet. Aus der semiquantitativen Auswertung (Abb 3.26) kann anhand der Peakfl\u00e4che und damit der Produktmenge f\u00fcr die Bildung der α,β -unges\u00e4tigten Hydro-

3 Ergebnisse

xyketone (*4S,5S*)-2 und (*4R,5R*)-2 für At2g29350 und ihre beiden Varianten geschlossen werden, dass das (*S*)-Enantiomer von WMK das bevorzugte Substrat für die drei Proteine ist.

Tab. 3.10: Qualitative Produktbildung ausgehend vom (*S*)-Wieland-Miescher- (a) und (*R*)-Wieland-Miescher-Keton (b). (+): Produkt konnte nachgewiesen werden, (-): Produkt konnte nicht nachgewiesen werden, (+*): Produkt konnte nachgewiesen werden, lag aber unterhalb des Quantifizierungslimits (LOQ: Signal:Rausch-Verhältnis von >5, Peakfläche von ≥ 40.000 und maximale prozentuale Standardabweichung von 12%). Ansatzbedingungen: 75 oder 150 $\mu\text{g/mL}$ Enzym, 1 mM Substrat, 3 mM NAD(P)H, pH-Optima der Enzyme, 3 h, 350 rpm, 30 °C. Extraktion mit Essigsäureethylester. Messung: GCMS, drei Wiederholungen mit drei technischen Replikaten (n = 3).

a)

b)

Enzym/Cosubstrat	a	b	c	d	e	f
At2g29350/NADPH	+	-	-	-	-	-
At2g29350(S26A,A48D)/NADH	+	-	-	-	-	-
At2g29350(V103A)/NADPH	+	-	-	-	-	-
CoTR/NADPH	+	-	-	-	-	-
CoTR/NADH	+	-	+	+	-	+
CoTR(A49D)/NADH	+	-	+	+	-	+*
CoTR(S27A,A49D)/NADH	+	-	+	+	-	+*
CG1/NADPH	+	-	-	-	-	-
CG1(T109F)/NADPH	+	-	-	-	-	-
CG1(S27A,A49D,T109F)/NADH	+	-	-	-	-	-
CG2/NADPH	+	-	-	-	-	-
CG2(T109F)/NADPH	+	-	-	-	-	-

Enzym/Cosubstrat	a	b	c	d	e	f
At2g29350/NADPH	+	-	-	-	-	-
At2g29350(S26A,A48D)/NADH	+	-	-	-	-	-
At2g29350(V103A)/NADPH	+	-	-	-	-	-
CoTR/NADPH	+	+	-	-	-	-
CoTR/NADH	+	+	-	-	+	-
CoTR(A49D)/NADH	+	+	-	-	+	-
CoTR(S27A,A49D)/NADH	+	+	-	-	-	-
CG1/NADPH	+	+	-	-	+	-
CG1(T109F)/NADPH	+	-	-	-	+	-
CG1(S27A,A49D,T109F)/NADH	+	-	-	-	-	-
CG2/NADPH	+	-	-	-	+	-
CG2(T109F)/NADPH	+	-	-	-	+	-

3 Ergebnisse

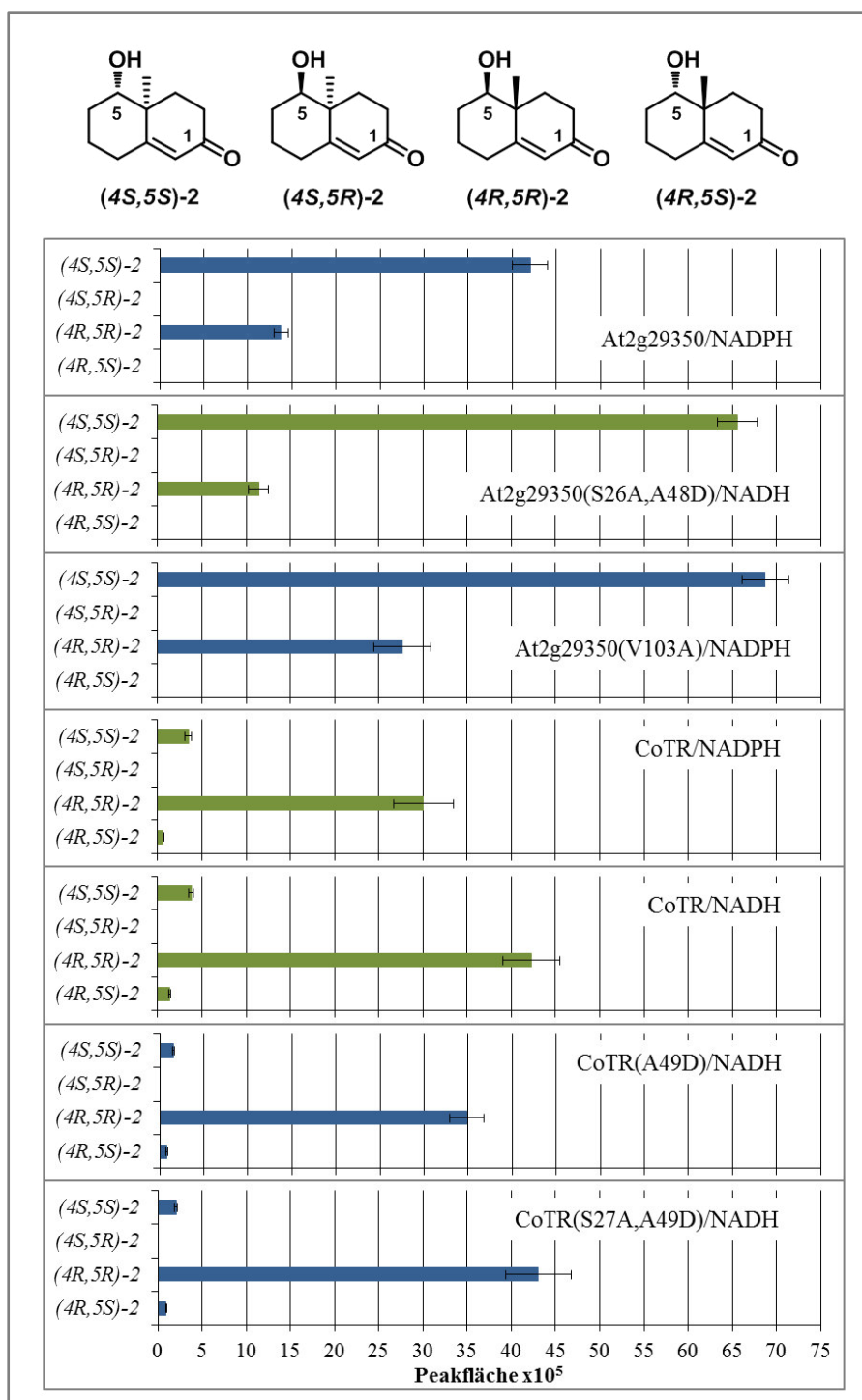


Abb. 3.26: Semiquantitative Auswertung der enzymatischen Bildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone durch At2g29350, CoTR und ausgewählten Enzymvarianten ausgehend von den (*S*)- und (*R*)-Enantiomeren des Wieland-Miescher-Ketons. Ansatzbedingungen: 75 $\mu\text{g/mL}$ (blau) oder 150 $\mu\text{g/mL}$ (grün) Enzym, 1 mM Substrat, 3 mM NAD(P)H, pH-Optima der Enzyme, 3 h, 350 rpm, 30 °C. Extraktion mit Essigsäureethylester. Messung: GCMS, drei Wiederholungen mit drei technischen Replikaten ($n = 3$), Angabe der Mittelwerte der Peakflächen mit Standardabweichung.

CoTR zeigte unter Verwendung von NADPH ausgehend vom (*R*)-Enantiomer von WMK die Bildung der beiden α,β -ungesättigten Hydroxyketone (4*R*,5*R*)-2 und (4*R*,5*S*)-2 (Tab. 3.10). Ausgehend vom (*S*)-Enantiomer wurde hingegen ausschließlich das (4*S*,5*S*)-2 detektiert. Un-

3 Ergebnisse

ter Berücksichtigung der semiquantitativen Auswertung (Abb. 3.26) ließ sich jedoch eine ca. 8x höhere Produktbildung von (4*R*,4*R*)-2 gegenüber (4*S*,5*S*)-2 detektieren und somit eine deutliche Bevorzugung von (*R*)-WMK als Substrat. Die semiquantitative Auswertung zeigte zudem, dass (4*R*,5*R*)-2 das Hauptprodukt für die Umsetzung des (*R*)-Enantiomers mit einer prozentualen Peakflächenverteilung von 98%:2% für (4*R*,5*R*)-2:(4*R*,5*S*)-2 ist. Wurde die Bildung der Nebenprodukte ausgehend von den Enantiomeren von WMK durch CoTR mit NADPH und NADH sowie CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) mit NADH verglichen, so fiel auf, dass die Anzahl und die gebildete Menge an Nebenprodukten von der Affinität zum Cosubstrat abhängig zu sein scheint. Sowohl für die Umsetzung des (*S*)- als auch des (*R*)-Enantiomers wurden durch CoTR unter Verwendung von NADH weitere Nebenprodukte (α,β -gesättigte Hydroxyketone und Diole, Tab. 3.10, Abb. 3.27) erhalten als mit NADPH.

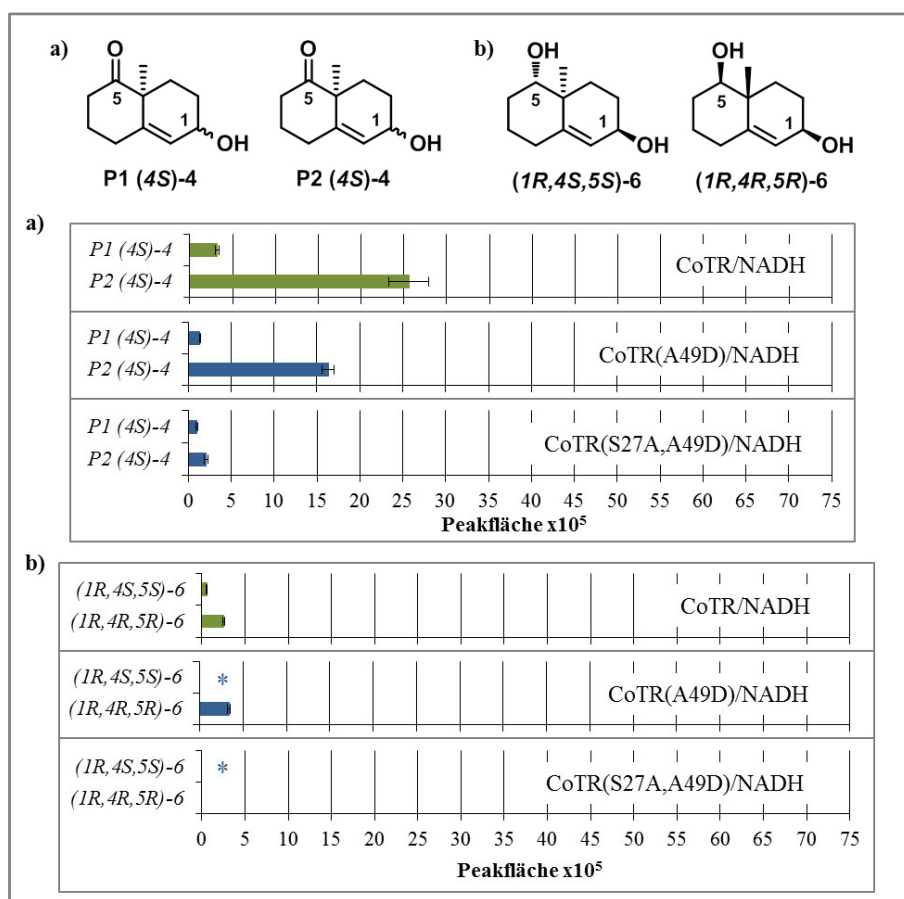


Abb. 3.27: Semiquantitative Auswertung der enzymatischen Bildung der Nebenprodukte durch CoTR, CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) ausgehend von den (*S*)- und (*R*)-Enantiomeren des Wieland-Miescher-Ketons. Bildung von a) P1 (4*S*)-4 und P2 (4*S*)-4 und von b) (1*R*,4*S*,5*S*)-6 und (1*R*,4*R*,5*R*)-6. Ansatzbedingungen: 75 μ g/mL (blau) oder 150 μ g/mL (grün) Enzym, 1 mM Substrat, 3 mM NADH, pH-Optima der Enzyme, 3 h, 350 rpm, 30 °C. Extraktion mit Essigsäureethylester. Messung: GCMS, drei Wiederholungen mit drei technischen Replikaten (n = 3), Angabe der Mittelwerte der Peakflächen mit Standardabweichung. (*) Produkt konnte nachgewiesen werden, lag aber unterhalb des Quantifizierungslimits (LOQ: Signal:Rausch-Verhältnis von >5, Peakfläche von ≥ 40.000 und maximale prozentuale Standardabweichung von 12%).

3 Ergebnisse

Für CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) wurden unter Verwendung von NADH für die Umsetzung des (*S*)-Enantiomers dieselben Haupt- und Nebenprodukte erhalten wie für das Wildtyp-Enzym mit NADH (Tab. 3.10). Aus der Integration der Peakflächen der Nebenprodukte (Abb. 3.27) ist jedoch ersichtlich, dass CoTR(S27A,A49D) mit der höchsten Affinität zu NADH im Vergleich zum Wildtyp-Enzym mit NADH und CoTR(A49D) nur sehr geringe Mengen der Nebenprodukte bildet. Zudem konnte für die Umsetzung des (*R*)-Enantiomers mit CoTR(S27A,A49D) im Gegensatz zu CoTR mit NADH und CoTR(A49D) kein weiteres Produkt detektiert werden als die beiden α,β -ungesättigte Hydroxyketone (*4R,5R*)-2 und (*4R,5S*)-2 (Tab. 3.10). Dies entspricht der Produktbildung ausgehend vom (*R*)-Enantiomer von CoTR mit NADPH. Die prozentuale Peakflächenverteilung für (*4R,5R*)-2:(*4R,5S*)-2 betrug wie für das Wildtyp-Enzym mit NADPH 98%:2%.

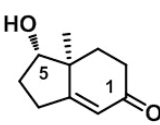
Die qualitative Auswertung der Produktbildung durch die Chimären CG1 und CG2 sowie CG1(T109F), CG1(S27A,A49D,T109F) und CG2(T109F) ausgehend vom (*S*)-WMK zeigte, dass als einziges Produkt das α,β -ungesättigte Hydroxyketon (*4S,5S*)-2 gebildet wird und somit eine Produktspezifität entsprechend der At2g29350 erhalten wurde (Tab. 3.10). Für die Umsetzung des (*R*)-Enantiomers wurde nur für die mit NADH aktive CG1(S27A,A49D,-T109F) ausschließlich das α,β -ungesättigte Hydroxyketon (*4R,5R*)-2 erhalten (Tab. 3.10). Für die anderen vier Enzyme konnte zudem das (*1R,4R,5R*)-Diol und für CG1 zusätzlich das α,β -ungesättigte Hydroxyketon (*4R,5S*)-2 detektiert werden. Auffällig an der semiquantitativen Auswertung der Bildung der (*4S,5S*)- und (*4R,5R*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketone war, dass bei den Chimären und Varianten (mit Ausnahme von CG1(S27A,A49D,T109F)) scheinbar keine ausgeprägte Bevorzugung für das (*S*)- oder das (*R*)-Enantiomer bestand (Abb. 6.5, Anhang). CG1(S27A,A49D,T109F) zeigte hingegen wie At2g29350 und deren Enzymvarianten eine Bevorzugung des (*S*)-Enantiomers.

In Tabelle 3.11 ist die qualitative Produktbildung für die Umsetzung der beiden Enantiomere von HPK aufgeführt und in Abbildung 3.28 die semiquantitative Auswertung der Bildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone. Für die Umsetzung der beiden Enantiomere von HPK durch At2g29350, At2g29350(S26A,A48D) und At2g29350(V103A) konnte eine ähnliche Produktbildung wie für die Enantiomere von WMK erhalten werden. Als einziges Produkt wurden jeweils (*4S,5S*)-1 bzw. (*4R,5R*)-1 ermittelt, zudem zeigte sich wie für WMK eine deutliche Bevorzugung von (*S*)-HPK (Abb. 3.28). Einzige Ausnahme war At2g29350(V103A), für die qualitativ auch das α,β -ungesättigte Hydroxyketon (*4R,5S*)-1 als Nebenprodukt nachgewiesen werden konnte (Tab. 3.11).

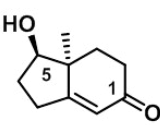
3 Ergebnisse

Tab. 3.11: Qualitative Produktbildung ausgehend vom (S)-Hajos-Parrish- (a) und (R)-Hajos-Parrish-Keton (b). (+): Produkt konnte nachgewiesen werden, (-): Produkt konnte nicht nachgewiesen werden, (+*): Produkt konnte nachgewiesen werden, lag aber unterhalb des Quantifizierungslimits (LOQ: Signal:Rausch-Verhältnis von >5, Peakfläche von ≥ 40.000 und maximale prozentuale Standardabweichung von 12%). Ansatzbedingungen: 75 oder 150 $\mu\text{g/mL}$ Enzym, 1 mM Substrat, 3 mM NAD(P)H, pH-Optima der Enzyme, 3 h, 350 rpm, 30 °C. Extraktion mit Essigsäureethylester. Drei Wiederholungen mit drei technischen Replikaten (n = 3).

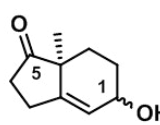
a)



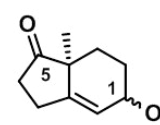
(4S,5S)-1
a



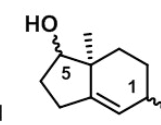
(4S,5R)-1
b



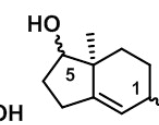
P1 (4S)-3
c



P2 (4S)-3
d



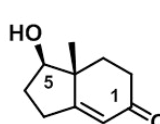
HP (4S)-5
e



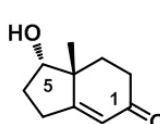
NP (4S)-5
f

Enzym/Cosubstrat	a	b	c	d	e	f
At2g29350/NADPH	+	-	-	-	-	-
At2g29350(S26A,A48D)/NADH	+	-	-	-	-	-
At2g29350(V103A)/NADPH	+	-	-	-	-	-
CoTR/NADPH	+	+*	-	-	-	-
CoTR/NADH	+	+*	+	+	-	-
CoTR(A49D)/NADH	+	+*	+	+	-	-
CoTR(S27A,A49D)/NADH	+	+*	+	+	-	-
CG1/NADPH	+	-	-	-	-	-
CG1(T109F)/NADPH	+	-	-	-	-	-
CG1(S27A,A49D,T109F)/NADH	+	-	-	-	-	-
CG2/NADPH	+	-	-	-	-	-
CG2(T109F)/NADPH	+	-	-	-	-	-

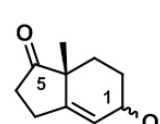
b)



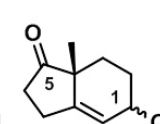
(4R,5R)-1
a



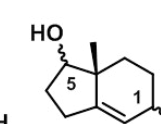
(4R,5S)-1
b



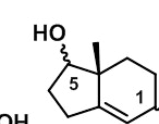
P1 (4R)-3
c



P2 (4R)-3
d



HP (4R)-5
e



NP (4R)-5
f

Enzym/Cosubstrat	a	b	c	d	e	f
At2g29350/NADPH	+	-	-	-	-	-
At2g29350(S26A,A48D)/NADH	+	-	-	-	-	-
At2g29350(V103A)/NADPH	+	+*	-	-	-	-
CoTR/NADPH	+	+	-	-	-	-
CoTR/NADH	+	+	-	-	-	-
CoTR(A49D)/NADH	+	+	-	-	-	-
CoTR(S27A,A49D)/NADH	+	+	-	-	-	-
CG1/NADPH	+	+	-	-	-	-
CG1(T109F)/NADPH	+	+*	-	-	-	-
CG1(S27A,A49D,T109F)/NADH	+	-	-	-	-	-
CG2/NADPH	+	+	-	-	-	-
CG2(T109F)/NADPH	+	-	-	-	-	-

3 Ergebnisse

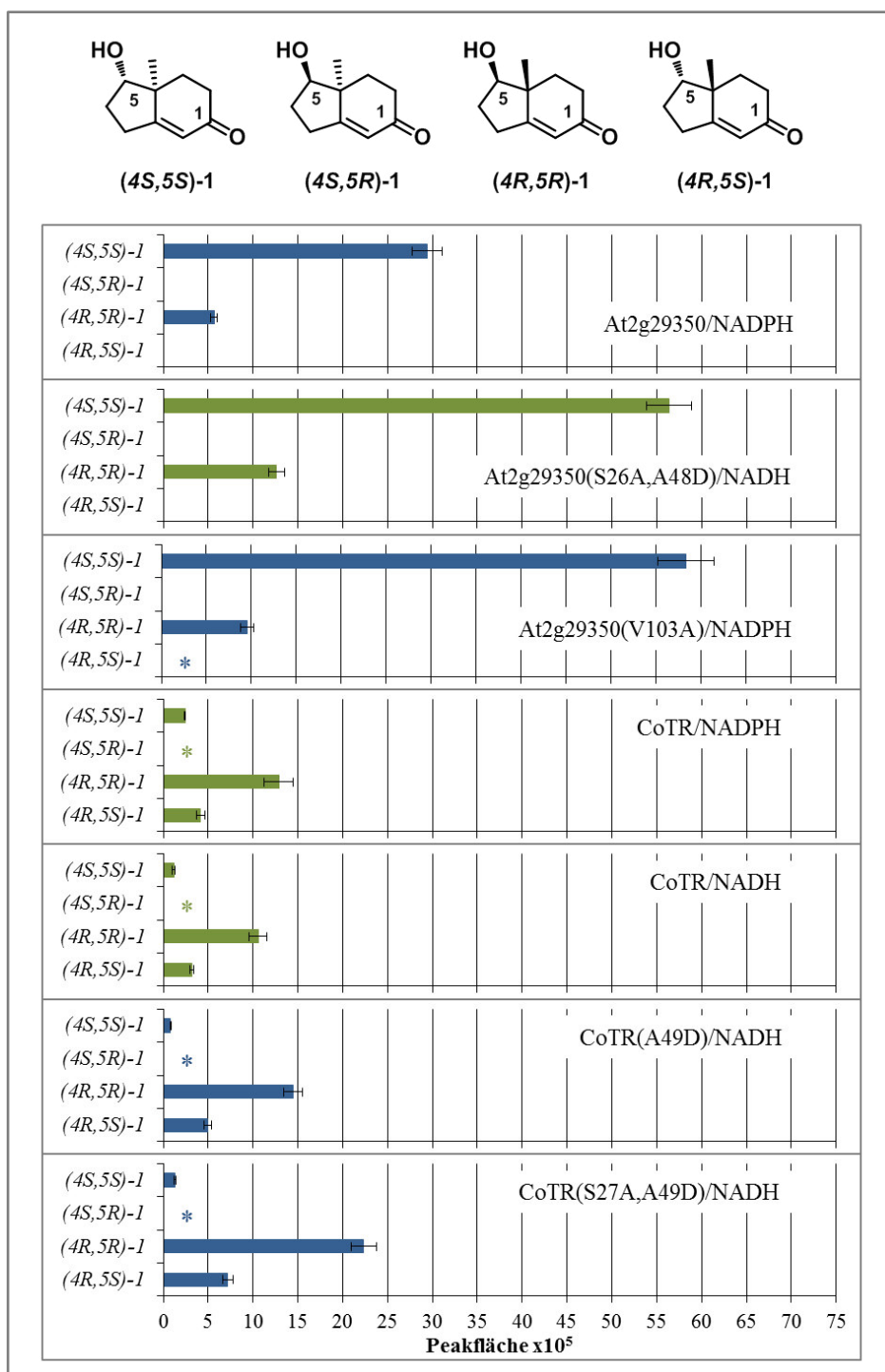


Abb. 3.28: Semiquantitative Auswertung der enzymatischen Bildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone durch At2g29350, CoTR und ausgewählten Enzymvarianten ausgehend von den (*S*)- und (*R*)-Enantiomeren des Hajos-Parrish-Ketons. Ansatzbedingungen: 75 µg/mL (blau) oder 150 µg/mL (grün) Enzym, 1 mM Substrat, 3 mM NAD(P)H, pH-Optima der Enzyme, 3 h, 350 rpm, 30 °C. Extraktion mit Essigsäureethylester. Messung: GCMS, drei Wiederholungen mit drei technischen Replikaten (n = 3), Angabe der Mittelwerte der Peakflächen mit Standardabweichung. (*) Produkt konnte nachgewiesen werden, lag aber unterhalb des Quantifizierungslimits. (LOQ: Signal:Rausch-Verhältnis von >5, Peakfläche von ≥ 40.000 und maximale prozentuale Standardabweichung von 12%).

Für CoTR, CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) zeigte sich, dass wie für WMK das (*R*)-Enantiomer von HPK als Substrat bevorzugt wurde (Abb. 3.28). Neben (4*S*,5*S*)-1 und

3 Ergebnisse

(4*R*,5*R*)-1 wurden für CoTR mit beiden Cosubstraten sowie für ihre beiden Enzymvarianten (4*S*,5*R*)-1 bzw. (4*R*,5*S*)-1 erhalten. Die Integration der Peakflächen ergab, dass (4*S*,5*R*)-1 und (4*R*,5*S*)-1 als Nebenprodukte gebildet wurden, jedoch lag die prozentuale Peakflächenverteilung weniger ausgeprägt auf der Seite des (4*R*,5*R*)-Produktes als beim WMK. So betrug die prozentuale Peakflächenverteilung von (4*R*,5*R*)-1:(4*R*,5*S*)-1 für CoTR mit NADPH 76%:24% und mit NADH 77%:23% sowie 75%:25% für CoTR(A49D) und 76%:24% für CoTR(S27A,A49D) (Abb. 3.28). Im Vergleich dazu lag die prozentuale Peakflächenverteilung von (4*R*,5*R*)-2:(4*R*,5*S*)-2 ausgehend von (*R*)-WMK bei 98%:2% für CoTR mit NADPH, CoTR(A49D) und CoTR(S27A, A49D) und bei 97%:3% für CoTR mit NADH (Abb. 3.26).

Bei der Umsetzung von (*S*)-HPK wurden für CoTR mit dem Cosubstrat NADH sowie für CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) die beiden möglichen α,β -gesättigten Hydroxyketone P1 (4*S*)-3 und P2 (4*S*)-3 als Nebenprodukte erhalten (Tab. 3.11). Jedoch zeigte sich auch hier erneut der Einfluss der Cosubstrat-Affinität auf die Bildung von Nebenprodukten (Abb. 3.29). So wurden für CoTR(S27A,A49D) weniger Nebenprodukte detektiert als für CoTR(A49D).

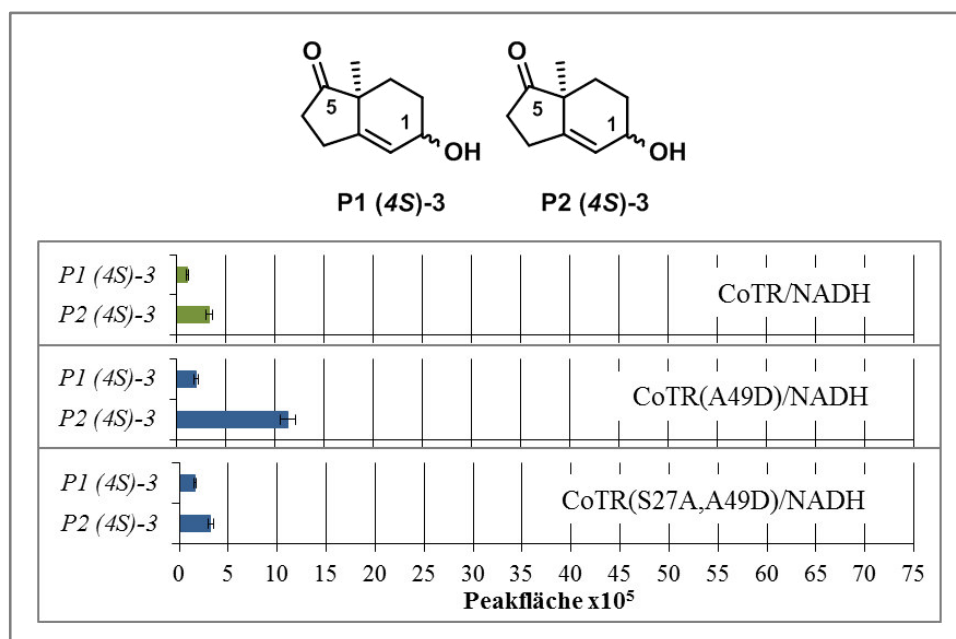


Abb. 3.29: Semiquantitative Auswertung der enzymatischen Bildung der Nebenprodukte P1 (4*S*)-3 und P2 (4*S*)-3 durch CoTR, CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) ausgehend von dem (*S*)-Enantiomer des Hajos-Parrish-Ketons. Ansatzbedingungen: 75 $\mu\text{g/mL}$ (blau) oder 150 $\mu\text{g/mL}$ (grün) Enzym, 1 mM Substrat, 3 mM NADH, pH-Optima der Enzyme, 3 h, 350 rpm, 30 °C. Extraktion mit Essigsäureethylester. Messung: GCMS, drei Wiederholungen mit drei technischen Replikaten ($n = 3$), Angabe der Mittelwerte der Peakflächen mit Standardabweichung.

Für die Chimären wurden als Produkte ausgehend von den Enantiomeren von HPK nur die α,β -ungesättigten Hydroxyketone erhalten. Bei der Umsetzung des (*S*)-Enantiomers von HPK

3 Ergebnisse

wurde bei allen fünf Enzymen nur (*4S,5S*)-1 detektiert (Tab. 3.11). Ausgehend vom (*R*)-Enantiomer wurde für alle Enzyme als Hauptprodukt (*4R,5R*)-1 ermittelt (Tab. 3.11). Für CG1, CG1(T109F) und CG2 wurden zudem auch geringe Mengen an (*4R,5S*)-1 detektiert. Im Vergleich zu den Enantiomeren von WMK konnte mit den Enantiomeren von HPK eine Bevorzugung des (*S*)-Enantiomers als Substrat festgestellt werden (Abb. 6.6, Anhang). Am deutlichsten war diese Bevorzugung für die mit NADH aktive CG1(S27A,A49D,T109F).

Zusammenfassend zeigten die GCMS-Messungen der Produktbildung für die Reduktion, dass At2g29350 und ihre beiden Enzymvarianten sowohl für WMK als auch HPK produktspezifisch das (*4S,5S*)- bzw. das (*4R,5R*)- α,β -ungesättigte Hydroxyketon bilden (Ausnahme: At2g29350(V103A)/(*R*)-WMK) und allgemein eine Präferenz für die (*S*)-Enantiomere der beiden Diketone als Substrate aufweisen. CoTR, CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) wiesen eine Präferenz gegenüber dem (*R*)-Enantiomer von WMK und HPK auf. Als Hauptprodukte werden ausgehend von den (*R*)-Enantiomeren der Substrate die (*4R,5R*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketone gebildet. Zudem wurde deutlich, dass mit einer geringeren Affinität zum Cosubstrat die Bildung von weiteren Nebenprodukten bzw. größeren Mengen an Nebenprodukt einhergehen. Die Chimären verhielten sich bezüglich der Produktbildung entsprechend ihrer C-terminalen Sequenz ähnlich zu dem At2g29350-Wildtyp-Enzym.

Zusätzlich zu den GCMS-Messungen für die Reduktion der Diketone wurde die Oxidation der synthetische hergestellten (*4S,5S*)- bzw. (*4R,5R*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketone durch die Enzyme getestet. Anhand der Bildung der Diketone zeigte sich eine Präferenz von At2g29350, At2g29350(S26A,A48D) und At2g29350(V103A) für die (*4S,5S*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketone gegenüber den (*4R,5R*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketonen (Abb. 6.7, Anhang). Für CoTR, CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) konnte eine Präferenz für die (*4R,5R*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketone gegenüber den (*4S,5S*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketonen beobachtet werden (Abb. 6.7, Anhang). Somit bestätigte die Messung der Oxidation die Substratspezifität der Reduktion.

3.3.4 Kinetische Charakterisierung der biokatalytischen Umsetzung der bicyklischen Diketone

Nach der Untersuchung der Produktbildung wurden die kinetischen Parameter (V_{\max} , K_m , k_{cat} und k_{cat}/K_m) der Proteine At2g29350, At2g29350(S26A,A48D), At2g29350(V103A), CoTR, CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) für die Umsetzung der Enantiomere der Diketone ermittelt (Tab. 3.12a und b).

3 Ergebnisse

Tab. 3.12: Kinetische Parameter für die Umsetzung der Enantiomere des Wieland-Miescher- (a) und des Hajos-Parrish-Ketons (b). Bedingungen: 0,2-0,7 mM NAD(P)H, 0,1-9 mM Substrat, pH-Optima der Enzyme, 30 °C. Photometrische Messungen der Absorptionsänderung von NAD(P)H bei 340 nm. Vier Wiederholungen mit vier technischen Replikaten (n = 4), Angabe der Mittelwerte mit Standardabweichung. Geplottet nach Michaelis und Menten. Die dazugehörigen Kurvenverläufe sind in Abbildung 6.8-6.10 im Anhang dargestellt.

a)	(S)-WMK		(R)-WMK	
	V_{\max} [nkat/mg] K_m [μ M]	k_{cat} [s^{-1}] k_{cat}/K_m [$s^{-1}\text{mM}^{-1}$]	V_{\max} [nkat/mg] K_m [μ M]	k_{cat} [s^{-1}] k_{cat}/K_m [$s^{-1}\text{mM}^{-1}$]
At2g29350/ NADPH	102,0 \pm 1,5 2374,0 \pm 99,7	3,09 \pm 0,05 1,30 \pm 0,45	-	-
CoTR/ NADPH	13,6 \pm 0,2 1401,2 \pm 65,8	0,42 \pm 0,01 0,30 \pm 0,09	14,9 \pm 0,3 305,5 \pm 24,6	0,46 \pm 0,01 1,50 \pm 0,31
CoTR(A49D)/ NADH	14,6 \pm 0,5 3274,2 \pm 266,1	0,45 \pm 0,02 0,14 \pm 0,06	28,0 \pm 0,4 1709,3 \pm 76,5	0,86 \pm 0,01 0,50 \pm 0,15
CoTR(S27A,A49D)/ NADH	17,1 \pm 0,4 2843,8 \pm 185,7	0,53 \pm 0,01 0,18 \pm 0,07	31,3 \pm 0,3 1216,1 \pm 48,3	0,96 \pm 0,01 0,79 \pm 0,21

b)	(S)-HPK		(R)-HPK	
	V_{\max} [nkat/mg] K_m [μ M]	k_{cat} [s^{-1}] k_{cat}/K_m [$s^{-1}\text{mM}^{-1}$]	V_{\max} [nkat/mg] K_m [μ M]	k_{cat} [s^{-1}] k_{cat}/K_m [$s^{-1}\text{mM}^{-1}$]
At2g29350/ NADPH	105,0 \pm 1,8 2153,2 \pm 108,8	3,18 \pm 0,05 1,48 \pm 0,50	k. A.	k. A.
CoTR/ NADPH	-	-	3,6 \pm 0,1 896,4 \pm 86,9	0,11 \pm 0,00 0,12 \pm 0,03
CoTR(A49D)/ NADH	-	-	3,7 \pm 0,1 1512,0 \pm 128,7	0,11 \pm 0,00 0,07 \pm 0,02
CoTR(S27A,A49D)/ NADH	-	-	6,1 \pm 0,2 1766,6 \pm 154,1	0,19 \pm 0,01 0,11 \pm 0,03

At2g29350 zeigte mit den (S)-Enantiomeren von WMK sowie HWK ein ähnliches kinetisches Verhalten. So wurden Maximalgeschwindigkeiten (V_{\max}) von ca. 100 nkat/mg und Affinitäten (K_m) im Bereich von 2153,2-2374,0 μ M erreicht. Die k_{cat} -Werte lagen bei ca. 3 s^{-1} und die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) bei 1,3-1,5 $s^{-1}\text{mM}^{-1}$. Für die Umsetzung von (R)-HPK konnten keine kinetischen Parameter ermittelt werden. Grund dafür war eine fast glockenförmige Sättigungskurve, die durch eine sehr geringe Affinität zum Substrat und eine ausgeprägte Substrat- bzw. Produktüberschusshemmung bedingt war (Abb. 6.8c, Anhang).

Da bei der Untersuchung von At2g29350(S26A,A48D) gezeigt werden konnte, dass bei einer Cosubstratkonzentration von 0,8 mM (Messgrenze der photometrischen Detektion) das Dimer-Tetramer-Gleichgewicht nicht vollständig auf der Seite des Tetramers liegt, konnten aus den Sättigungskurven mit den (S)-Enantiomeren der Diketone keine kinetischen Parameter für At2g29350(S26A,A48D) und At2g29350(V103A) bestimmt werden. Abbildung 3.30 zeigt die

3 Ergebnisse

spezifischen Enzymaktivitäten von At2g29350(S26A,A48D) und At2g29350(V103A) in Abhängigkeit von den Substratkonzentrationen von (*S*)-WMK und (*S*)-HPK. Für At2g29350(S26A,A48D) wurden leicht sigmoide Kurvenverläufe erhalten, die ab einer Substratkonzentration von 15-20 mM für (*S*)-WMK und 10 mM für (*S*)-HPK eine konstante spezifische Aktivität von ca. 50-60 nkat/mg zeigten. Für At2g29350(V103A) wurden ebenfalls sigmoide Kurvenverläufe erhalten. Für (*S*)-WMK konnte bis zu einer Substratkonzentration von 15 mM keine konstante spezifische Aktivität erreicht werden, jedoch wurde ein Wert von ca. 120 nkat/mg erhalten. Für (*S*)-HPK wurde ab einer Substratkonzentration von 15 mM eine konstante Aktivität von ca. 100 nkat/mg erreicht.

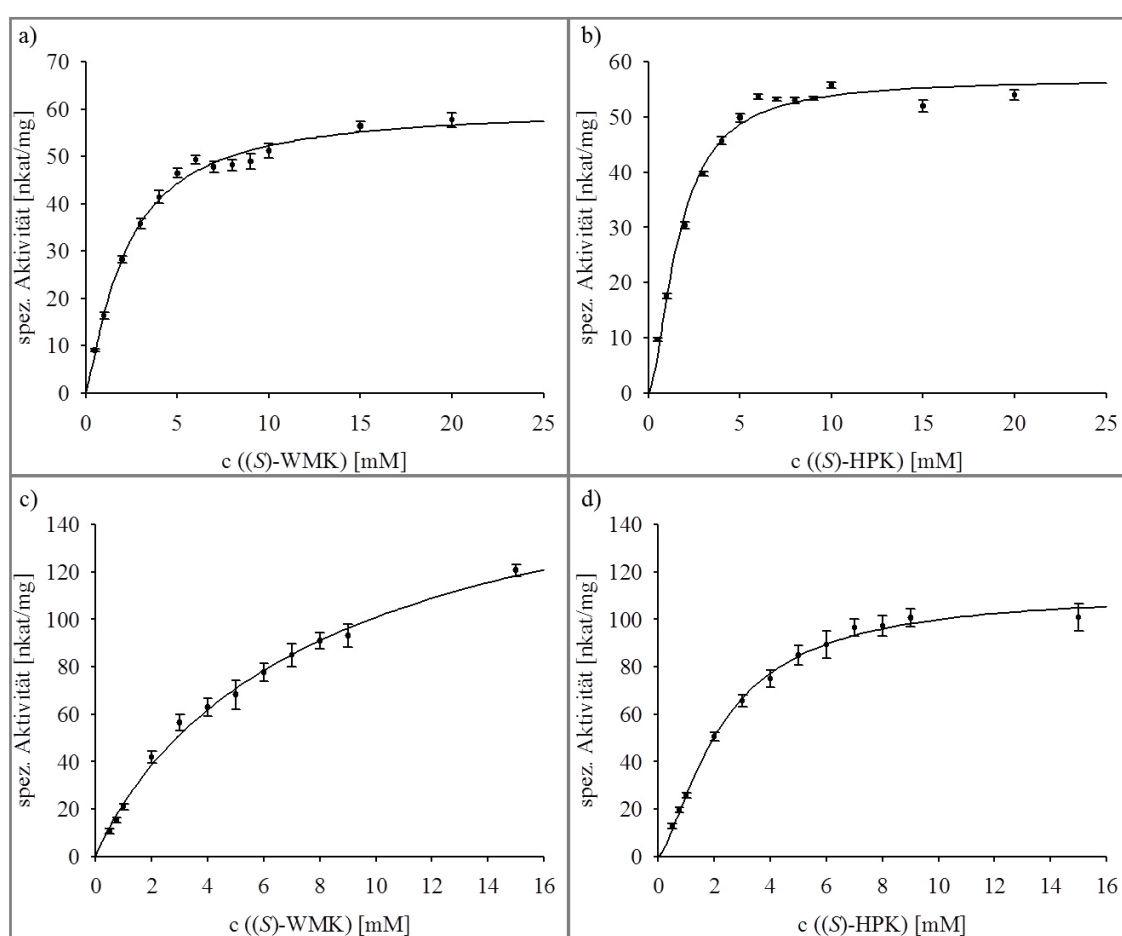


Abb. 3.30: Spezifische Enzymaktivitäten von At2g29350(S26A,A48D) und At2g29350(V103A) in Abhängigkeit von den Diketonkonzentrationen. At2g29350(S26A,A48D): Abhängigkeit von a) (*S*)-WMK-Konzentration (NADH: 0,8 mM) und von b) (*S*)-HPK-Konzentration (NADH: 0,8 mM). At2g29350(V103A): Abhängigkeit von c) (*S*)-WMK-Konzentration (NADPH: 0,8 mM) und von d) (*S*)-HPK-Konzentration (NADPH: 0,8 mM). Messung bei den pH-Optima und 30 °C. Photometrische Messungen der Absorptionsänderung von NAD(P)H bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus vier Wiederholungen mit vier technischen Replikaten (n = 4). Zur graphischen Betrachtung nach Hill (1910) geplottet.

Für CoTR und ihre Enzymvarianten fiel auf, dass die Affinität zu den (*R*)-Enantiomeren der beiden Diketone höher war als die Affinität der At2g29350 zu den (*S*)-Enantiomeren (Tab.

3 Ergebnisse

3.12; K_m : 305,5-1766,6 μM vs. 2153,2-2374,0 μM). Jedoch erreichten CoTR, CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) viel geringere Maximalgeschwindigkeiten (Tab. 3.12). Dieses Verhalten spiegelte sich auch in niedrigeren k_{cat} -Werten für CoTR und die CoTR-Varianten im Vergleich zu At2g29350 wider. Wurden CoTR, CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) miteinander verglichen, so fiel auf, dass alle drei Enzyme für das (*R*)-Enantiomer von WMK höhere Maximalgeschwindigkeiten erreichten als für das (*R*)-Enantiomer von HPK. CoTR zeigte für die beiden (*R*)-Enantiomere höhere Affinitäten als CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D). Somit scheint auch hier die Affinität zum Cosubstrat einen Einfluss auf die Bindung der Substrate zu haben. CoTR(S27A,A49D) erreichte mit NADH als Cosubstrat im Vergleich zum Wildtyp-Enzym mit NADPH doppelt so hohe Maximalgeschwindigkeiten mit beiden (*R*)-Enantiomeren, die sich in ca. doppelt so hohen k_{cat} -Werten für CoTR(S27A,A49D) im Gegensatz zu CoTR widerspiegeln. Die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) war hingegen aufgrund der höheren Substrataffinität für CoTR höher. Für das (*S*)-Enantiomer von WMK zeigte CoTR im Vergleich zu At2g29350 eine höhere Affinität, allerdings bei einer deutlich geringeren Maximalgeschwindigkeit, die nur noch 13% des Wertes von At2g29350 betrug. CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) wiesen kaum höhere Maximalgeschwindigkeiten als CoTR und zusätzlich geringere Affinitäten als die beiden Wildtyp-Enzyme auf. Für CoTR konnten mit NADH als Cosubstrat keine kinetischen Parameter für die Umsetzung der Diketone ermittelt werden.

3.4 Kristallisation von CoTR und At2g29350

Durch die geringe Konservierung im Bereich der Substratbindetasche innerhalb der SDR und durch das Fehlen von vier Aminosäuren im Bereich der Helix $\alpha G'$ der TRL und CoTR im Vergleich zur Sequenz von DsTRII (Template für Modelle) waren die vorhandenen Strukturmodelle (Fischer, 2015) für die Substratbindetasche stark limitiert (vergl. Abschnitt 1.5 und Abb. 6.11, Anhang). Aus diesem Grund wurde der Versuch unternommen, für diese Enzyme die Kristallstrukturen zu bestimmen. Auf Grundlage dieser Strukturen sollten die Mechanismen von Substrat- und Cosubstratbindung, Substratelektivität und Produktbildung weiter aufgeklärt werden.

3.4.1 Kristallisationsbedingungen

Für das Screening der Kristallisationsbedingungen wurden die Enzyme in einer Konzentration von 15 mg/ml eingesetzt. Beide Enzyme wurden sowohl als Apoenzym als auch in Cokristallisationsansätzen (Abschnitt 2.2.9.1) zusammen mit Cosubstrat und Substrat untersucht. Für die Cokristallisationsansätze wurde der inaktive Keton/NADP⁺-Komplex gewählt, da es so

3 Ergebnisse

nicht zur Umsetzung durch das Enzym kommen kann und im besten Fall ein ternärer Komplex erhalten wird. Für At2g29350 wurden die Cokristallisationsversuche mit (*S*)-WMK und (*S*)-HPK durchgeführt. Zusätzlich wurden Ansätze mit den beiden Monoterpenen (-)-Menthon und (-)-Carvon (Abb. 3.31) getestet, da At2g29350 höhere Affinitäten zu den beiden Monoterpenen als zu den Diketonen zeigte (Reinhardt, 2014). Für CoTR wurden Cokristallisationsansätze mit (*R*)-WMK und Tropinon durchgeführt sowie mit (-)-Carvon und dem monozyklischen Diketon 1,4-Cyclohexadion. Zu (-)-Carvon zeigte CoTR eine höhere Affinität als zu den Diketonen (Reinhardt, 2014).

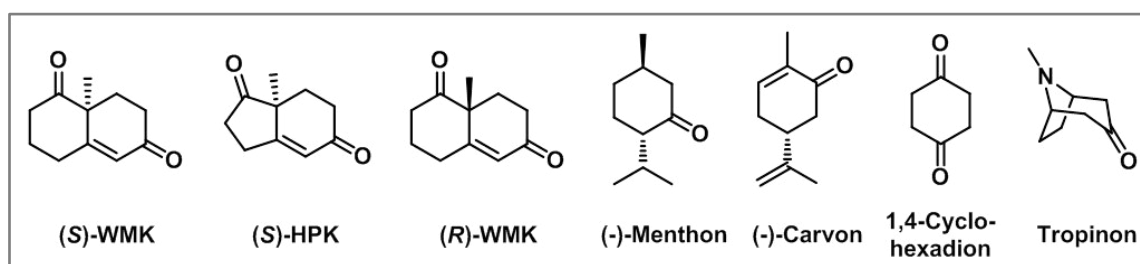


Abb. 3.31: Eingesetzte Substrate für die Cokristallisationsversuche.

Für At2g29350 konnten in den Screenings mit verschiedenen, kommerziell erhältlichen Kristallisationskits keine geeigneten Kristallisationsbedingungen gefunden werden. CoTR zeigte hingegen unter verschiedenen Bedingungen die Bildung von Kristallen. Durch die Variation von Proteinkonzentration und pH-Wert konnten größere Kristalle mit besseren Beugungseigenschaften erhalten werden (Abschnitt 2.2.9.2; Tab. 6.14, Anhang). Kristalle mit sehr guten Beugungseigenschaften wurden aus den optimierten Bedingungen A und B erhalten (Tab. 3.13).

Tab. 3.13: Kristallisationsbedingungen von CoTR. Initiale Bedingungen aus dem 96-Well-Screening und optimierte Bedingungen aus dem 15-Well-Screening.

Bedingung	Initiale Bedingungen	Optimierte Bedingungen
A	0,1 M Natriumacetat-Puffer, 8% PEG 4000, pH 4,6	0,1 M Natriumacetat-Puffer, 8% PEG 4000, pH 5,0
	15 mg/mL CoTR, 0,58 mM NADP ⁺ und (<i>R</i>)-WMK 15 °C, 2 Wochen	13 mg/mL CoTR, 0,51 mM NADP ⁺ und (<i>R</i>)-WMK 15 °C, 3-4 Wochen
B	35% Dioxan V/V	35% Dioxan V/V
	15 mg/mL CoTR, 0,58 mM NADP ⁺ und (-)-Carvon 15 °C, 1 Wochen	11 mg/mL CoTR, 0,43 mM NADP ⁺ und (<i>R</i>)-WMK 15 °C, 8-10 Wochen

3 Ergebnisse

Den optimierten Bedingungen sind in Tabelle 3.13 die initialen Bedingungen aus dem 96-Well-Screening gegenübergestellt. Beide Bedingungen enthalten einen 1,2 molarer Überschuss an NADP⁺ und Substrat. In Abbildung 3.32 sind Kristalle aus den Bedingungen A und B gezeigt. Aus den Kristallen a und b wurden die Kristallstrukturen ermittelt.

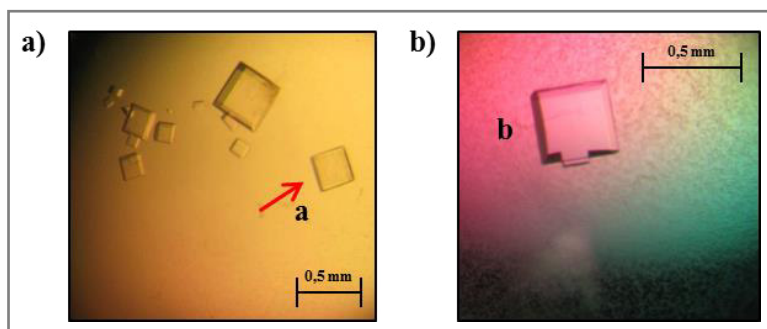


Abb. 3.32: Kristalle von CoTR aus Bedingung A (a) und B (b).

Zur Beugungsanalyse der Kristalle wurde den jeweiligen Kristallisationslösungen Ethylenglycol (EG) als Kryoschutz zugefügt (Kristall a: 27% EG; Kristall b: 40% EG). Der Kryopuffer für den Kristall b enthielt zusätzlich 25 mM (*R*)-WMK und 0,6 mM NADP⁺. Vor der Beugungsanalyse wurde der Kristall in dem Kryopuffer ca. 1 min inkubiert, um eine zusätzliche Substrataufnahme zu ermöglichen bzw. die Diffusion der gebundenen Liganden zu unterbinden (Back-Soaking).

3.4.2 Kristallstruktur von CoTR

Von den beiden Kristallen a und b konnten durch Dr. C. Parthier (MLU, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Physikalische Biotechnologie) Röntgenbeugungsdatensätze gemessen und die Kristallstruktur aufgeklärt werden. Die allgemeinen Angaben zu den beiden Kristallstrukturen A und B sind in Tabelle 3.14 aufgelistet. Die Statistik der Datensammlung und Strukturverfeinerung sind in Tabelle 6.19 im Anhang wiedergegeben.

Tab. 3.14: Angaben zu den Kristallstrukturen. (EG = Ethylenglycol)

Kristall/ Struktur	Auflösung	Raum- gruppe	Zellkonstanten	asymmetrische Einheit	Liganden
a/A	1,77 Å	P2 ₁ 2 ₁ 2	$\alpha = \beta = \gamma = 90,00$ a = 117,992; b = 77,938; c = 116,331	4 Monomere	4x NADP ⁺ 5x Acetat 3x EG 785x H ₂ O
b/B	1,44 Å	C2	$\alpha = \gamma = 90,00$; $\beta = 103,01$ a = 74,596; b = 116,008; c = 118,123	4 Monomere	4x NADP ⁺ 14x EG 4x Dioxan 584x H ₂ O

3 Ergebnisse

Beide Strukturen konnten mit hoher Auflösung bestimmt werden (1,77 Å und 1,44 Å). Die Symmetrie der Kristallstruktur A (1,77 Å) wurde durch die orthorhombische Raumgruppe $P2_12_12$ bestimmt, die der Kristallstruktur B (1,44 Å) durch die monokline Raumgruppe $C2$. Anhand der erhaltenen Elektronendichte konnten die Struktur und die Konformation von allen Aminosäuren im Bereich S12/R13 bis F268/K269 bestimmt werden. Die asymmetrische Einheit besteht in beiden Strukturen aus vier Ketten (A-D), die eine nichtkristallografische Symmetrie zueinander aufweisen (Abb. 3.33).



Abb. 3.33: Asymmetrische Einheiten der Kristallstrukturen A (a) und B (b) von CoTR. Bestehend aus je vier Monomeren (Kette A-D), zusätzlich dargestellt sind die benachbarten symmetrieverwandten asymmetrischen Einheiten, welche für die Bildung der Tetramere verantwortlich sind. Grün: Kette A; hellblau: Kette B; pink: Kette C; gelb: Kette D; grau: symmetrieverwandte asymmetrische Einheiten mit den Ketten A(sym) - D(sym).

3 Ergebnisse

Innerhalb der beiden asymmetrischen Einheiten weisen jeweils die Ketten A und B sowie C und D nichtkristallographische Symmetrie über zweizählige Rotationsachsen auf (Abb. 3.34).

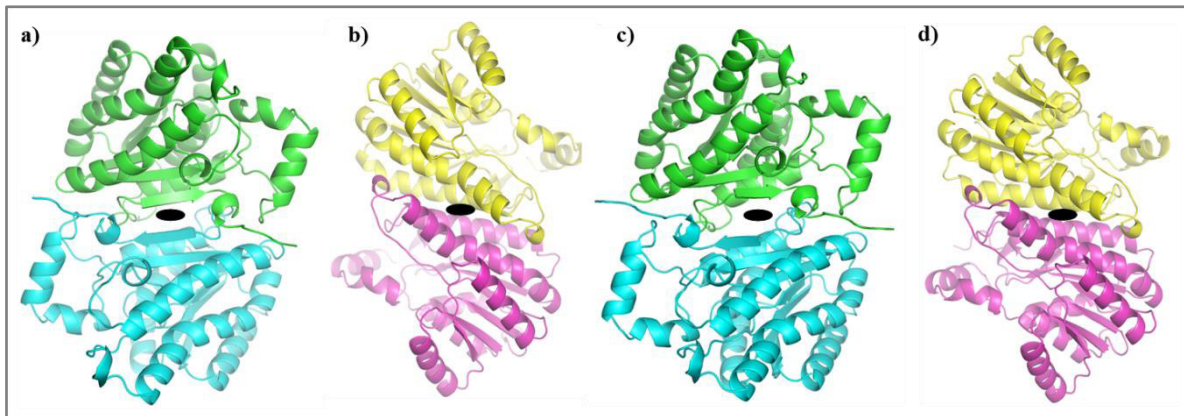


Abb. 3.34: Nichtkristallographische Symmetrie (zweifache Symmetrie 180°-Rotation) innerhalb einer asymmetrischen Einheit zwischen den Ketten A und B sowie C und D in den Kristallstrukturen A (a und b) und B (c und d). Grün: Kette A; hellblau: Kette B; pink: Kette C; gelb: Kette D.

Die beiden Ketten A und B sowie die Ketten C und D stehen in den asymmetrischen Einheiten über große Interaktionsflächen in Verbindung, welche an der Ausbildung der eigentlichen Quartärstruktur beteiligt sind (Tab. 3.15). Wird die asymmetrische Einheit durch ihre symmetrieverwandten Moleküle ergänzt (Abb. 3.33), so zeigt sich, dass CoTR in der kristallinen Form (wie auch in Lösung, Abschnitt 3.1.4.5) als Tetramer vorliegt. Dabei werden aus den vier Ketten A-D zwei Tetramere A/A(sym)/B/B(sym) und C/D/C(sym)/D(sym) gebildet. In Abbildung 3.35 sind exemplarisch die beiden entsprechenden Tetramere der Kristallstruktur B dargestellt. Für das erste Tetramer A/A(sym)/B/B(sym) bilden zuerst zwei Ketten A sowie zwei Ketten B aus zwei asymmetrischen Einheiten die Dimere A/A(sym) und B/B(sym) über die Q-Achse (Abb. 3.35). Die Q-Achse ist identisch mit der zweizähligen Rotationsachse der nichtkristallographischen Symmetrie der Ketten C und D (Ghosh et al., 1991). Die beiden Dimere lagern sich dann über die P-Achse zum Tetramer A/A(sym)/B/B(sym) zusammen (Abb. 3.35). Die P-Achse ist identisch mit der zweizähligen Rotationsachse der nichtkristallographischen Symmetrie der Ketten A und B (Ghosh et al., 1991). Die Dimere für das Tetramer C/D/C(sym)/D(sym) werden durch die Ketten C und D innerhalb einer asymmetrischen Einheit gebildet (Dimer C/D). Durch die Interaktion mit einem weiteren Dimer (C(sym)/D(sym)) aus einer benachbarten asymmetrischen Einheit entlang der P-Achse wird das zweite Tetramer C/D/C(sym)/D(sym) erhalten. Ein Vergleich der beiden Tetramere A/A/B/B und C/D/C/D innerhalb der beiden Kristallstrukturen ist in Abbildung 6.14 im Anhang dargestellt. Unterschiede zwischen den Tetrameren liegen im Bereich $\alpha C/\beta C/\alpha D$ der Rossmann-Faltung und kommen durch die Packung im Kristall zustande (siehe Abschnitt 3.4.3.1)

3 Ergebnisse

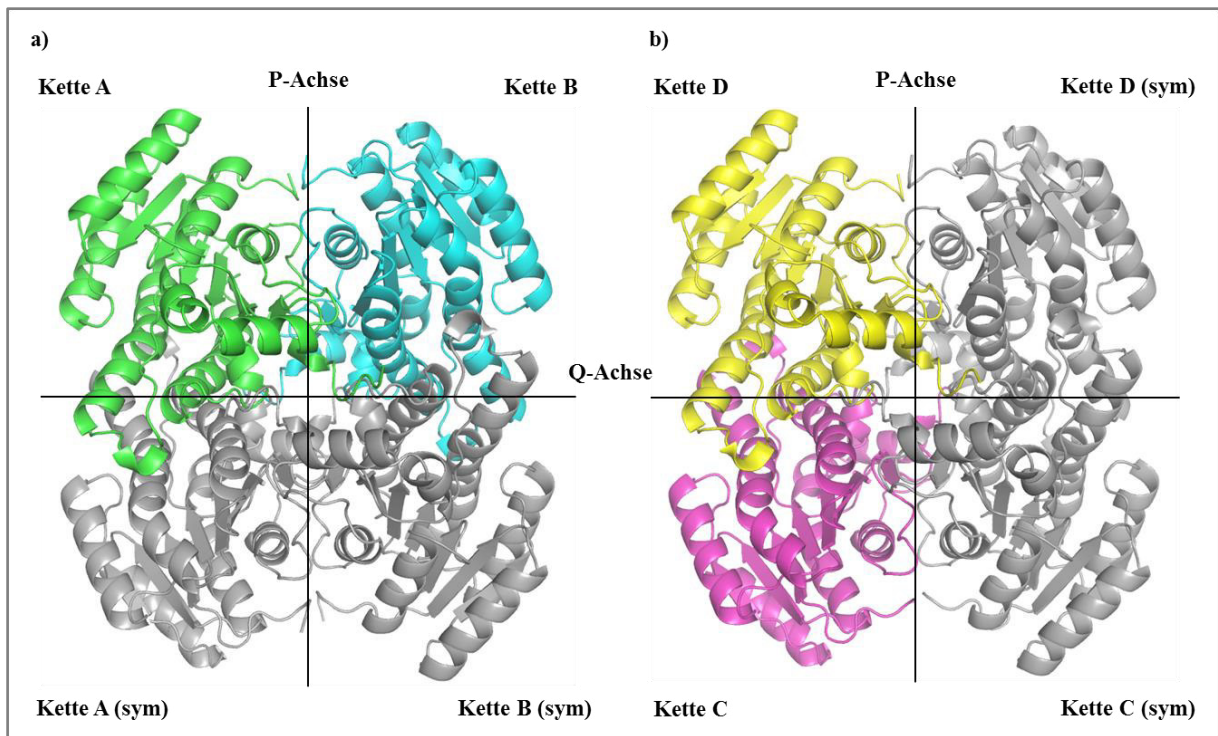


Abb. 3.35: Tetramer A/A/B/B von CoTR aus den Dimeren A/A(sym) und B/B(sym) (a) und Tetramer C/D/C/D von CoTR aus den Dimeren C/D und C(sym)/D(sym) (b). Kristallstruktur B. Grün: Kette A; hellblau: Kette B; pink: Kette C; gelb: Kette D; grau: Ketten A-D aus benachbarten asymmetrischen Einheiten (sym). Ausbildung der Dimere entlang der Q-Achse und der Tetramere entlang der P-Achse.

Die Interaktionsflächen für die Ausbildung der Dimere sowie für die Ausbildung der Tetramere zwischen den einzelnen Ketten (vergl. Abb. 3.35) sind in Tabelle 3.15 aufgezeigt. Die Flächen für die Ausbildung der Dimere sind innerhalb und zwischen den Ketten der beiden Kristallstrukturen nahezu gleich groß. Bei den Interaktionsflächen für die Ausbildung der Tetramere fällt auf, dass die Fläche zwischen Kette A und B in Kristallstruktur A etwas größer ist als zwischen den anderen Ketten. Die an den Interaktionsflächen beteiligten Aminosäuren unterscheiden sich nicht zwischen den Dimeren innerhalb und zwischen den Kristallstrukturen. Die Interaktionsflächen für die Tetramere unterscheiden sich nur in der zusätzlichen Beteiligung von A245 in Kristallstruktur B. Eine detailliertere Betrachtung der beteiligten Aminosäuren für die Ausbildung der Interaktionsflächen zur Bildung der Quartärstruktur erfolgt in Abschnitt 3.4.3. Zusätzlich zu den großen Interaktionsflächen kommt es zwischen den Ketten A/B(sym), A(sym)/B, C/D(sym) und C(sym)/D zu polaren Kontakten innerhalb des Tetramers (vergl. Abb. 3.35, Tab. 3.15). Die Hauptketten der Aminosäuren V262, F265 und F267 des einen Monomers bilden Wasserstoffbrücken zu der Hauptkette von H161 bzw. der Seitenkette von N163 des anderen Monomers.

3 Ergebnisse

Tab. 3.15: Interaktionsflächen zur Ausbildung der Quartärstruktur in den Kristallstrukturen A und B. Analysiert mit PDBePISA/ EMBL-EBI. (sym) = Kette aus benachbarter asymmetrischer Einheit.

Kette 1	Kette 2	Fläche [Å^2]	Quartärstruktur
Kristallstruktur A			
A	A(sym)	1387,5	Dimer
B	B(sym)	1375,2	Dimer
C	D	1371,0	Dimer
A	B	1617,8	Tetramer
C	C(sym)	1575,6	Tetramer
D	D(sym)	1566,5	Tetramer
A	B(sym)	785,6	Tetramer
C	D(sym)	784,9	Tetramer
Kristallstruktur B			
A	A(sym)	1380,6	Dimer
B	B(sym)	1380,2	Dimer
C	D	1376,4	Dimer
A	B	1571,9	Tetramer
C	C(sym)	1583,6	Tetramer
D	D(sym)	1570,1	Tetramer
A	B(sym)	776,6	Tetramer
C	D(sym)	771,4	Tetramer

Weitere Interaktionsflächen kommen zwischen den Ketten innerhalb und zwischen den asymmetrischen Einheiten durch die Packung in den Kristallen zustande. Diese Kristallkontakte sind nicht an der Ausbildung der Quartärstruktur beteiligt und sind in Tabelle 6.20 im Zusammenhang mit Abbildung 6.15 und 6.16 im Anhang aufgezeigt.

3.4.3 Detaillierte Analyse der Kristallstruktur von CoTR

Um die Beschreibung zu vereinfachen wird sich im Vergleich immer auf die Kette A der Kristallstruktur B bezogen, mit der später die Dockingstudien (Abschnitt 3.5) durchgeführt wurden.

3.4.3.1 Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur

Wie alle SDR weist auch CoTR die für dinukleotidbindende Enzyme typische Rossmann-Faltung auf (Abb. 3.36). Die Rossmann-Faltung wird durch das zentrale, aus sieben Segmenten bestehende β -Faltblatt (β A- β G) und die flankierenden α -Helices (α B- α F, α G) gebildet. Die

3 Ergebnisse

Bezeichnung der Sekundärstruktur erfolgt entsprechend der Tropinonreduktasen (Nakajima et al., 1998).

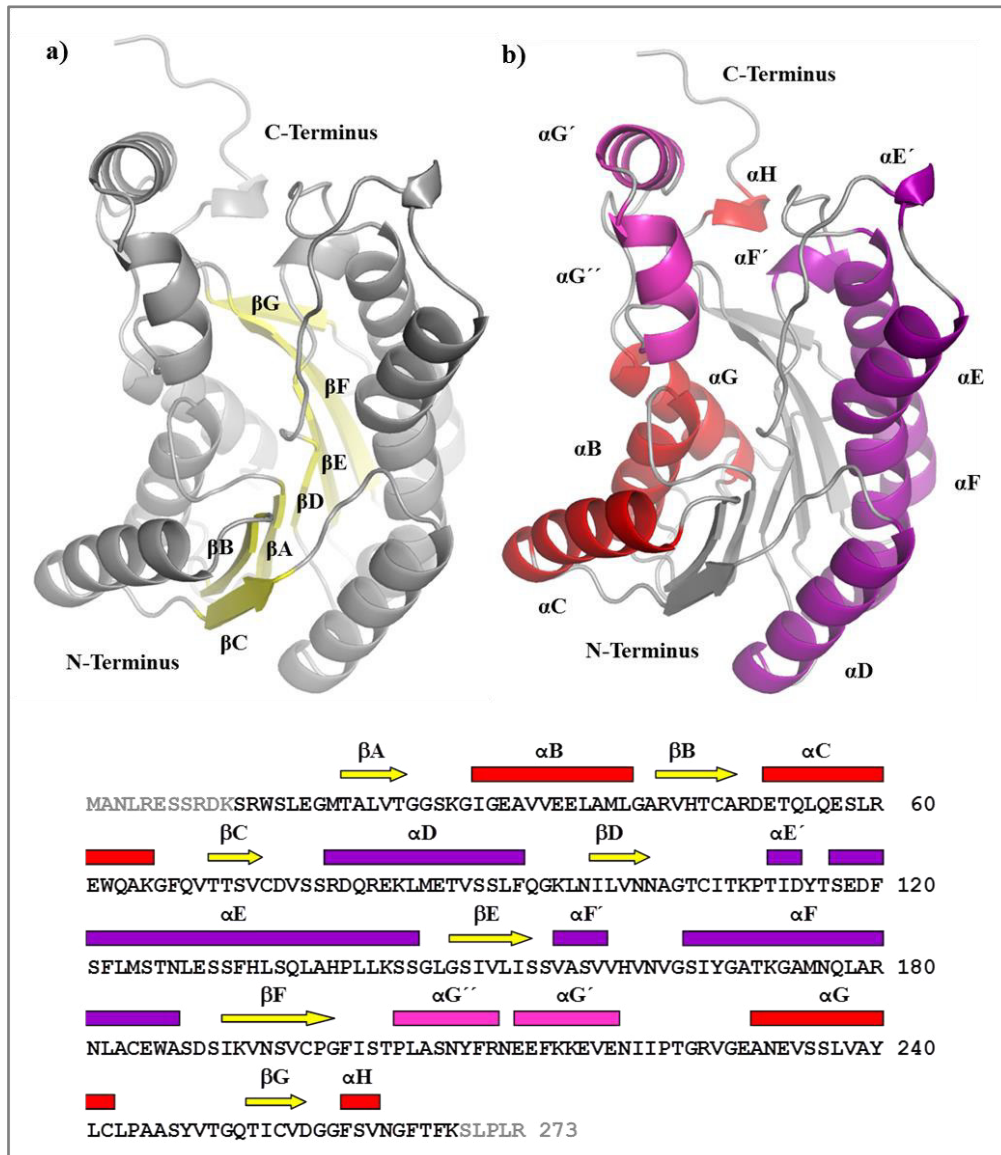


Abb. 3.36: Sekundär- und Tertiärstruktur von CoTR. Kette A der Kristallstruktur B mit eingefärbten Sekundärstrukturelementen. a) gelb: β -Faltblattstrukturen β A-G; b) α -Helices: rot: α B, α C, α G, α H auf einer Seite der β -Faltblattstrukturen; violett: α D- α F auf anderer Seite der β -Faltblattstrukturen; pink: α G' und α G'' der Substratbindetasche. In der Aminosäuresequenz sind die Elemente der Sekundärstruktur analog gefärbt. Buchstaben in Sequenz grau: Aminosäuren in Struktur nicht sichtbar.

Die Helices α G' und α G'' sind vor allem für die Substratbindung von Bedeutung (Kavanagh et al., 2008). Durch die Rossmann-Faltung und die beiden Helices α G' und α G'' wird der für die SDR typische Spalt in der Struktur gebildet, der die Cosubstrat- und Substratbindetasche enthält. Hier wird über einen vermutlichen bi-bi-Mechanismus zuerst N-terminal das Cosubstrat und danach C-terminal das Substrat gebunden (vergl. Abschnitt 1.3). Die Zuordnung der Sekundärstruktur unterscheidet sich in den vier Ketten A-D der Kristallstrukturen A und B nur

3 Ergebnisse

gering und ist auf Rückgrat-Ebene kaum zu erkennen. Wurde die Tertiärstruktur der einzelnen Monomere innerhalb und zwischen den beiden Kristallstrukturen auf Rückgrat-Ebene verglichen, so fielen leichte Verschiebungen vor allem im Bereich $\alpha C/\beta C/\alpha D$ der Rossmann-Faltung auf (Abb. 6.17 und 6.18, im Anhang). Die RMSD-Werte für den Vergleich der einzelnen Monomere zueinander liegen innerhalb der Strukturen zwischen 0,117 und 0,205 und zwischen den Strukturen zwischen 0,160 und 0,268 und weisen somit auf nur sehr geringe Unterschiede zwischen den Ketten und Strukturen hin. Die genauen Werte sind in Tabelle 6.21 im Anhang aufgeführt. Die Verschiebungen im Bereich $\alpha C/\beta C/\alpha D$ können dadurch erklärt werden, dass dieser Bereich in beiden Strukturen für die Ausbildung der größeren Kristallkontakte (Struktur A: KK 2. und KK3.; Struktur B: KK 5. und KK 6.; Tab. 6.20, Anhang) verantwortlich ist (vergl. Abb. 6.15-6.19, Anhang). Zusätzlich gibt es einen sichtbaren Unterschied in der Darstellung von βG im Bereich der Aminosäure Q252 zwischen den Monomeren der Struktur A und B (Abb. 6.18, Anhang). Dieser Unterschied ist jedoch der Tatsache geschuldet, dass in Struktur B in allen vier Ketten auf Grund der hohen Auflösung zwei Konformationen für Q252 gefunden werden können und es so in der Darstellung des Faltblattes durch das Programm (Pymol) in diesem Bereich zu Problemen kommt. Wird nur die Hauptkette betrachtet sind keine Unterschiede sichtbar. Allgemein sind durch die Unterschiede in der Struktur von $\alpha C/\beta C/\alpha D$ keine funktionellen Bereiche (Cosubstrat- und Substratbindetasche) betroffen.

Die Ausbildung der Dimere erfolgt über die Interaktion innerhalb eines vier Helix-Bündels (Abb. 3.37; Ghosh et al., 1991). So lagern sich die Helices αE und αF der einen Kette mit den entsprechenden Helices der zweiten Kette gedreht um 180° so nebeneinander, dass im Kern eine hydrophobe Interaktionsfläche entsteht, innerhalb der keine Wassermoleküle zu finden sind. Zusätzlich wird das Dimer durch einige polare Bindungen, vor allem ausgehend von den kurzen Helices $\alpha E'$ und $\alpha F'$ rund um den hydrophoben Bereich stabilisiert.

Die beiden Tetramere werden überwiegend über polare Wechselwirkungen zwischen den C-terminalen Bereichen der Dimere entlang der P-Achse gebildet (Abb. 3.37). Dafür lagern sich die αG -Helices und die βG -Faltblätter der beiden Dimere antiparallel zueinander. Zwischen den Aminosäureseitenketten R13 und E37 kommt es zusätzlich zur Ausbildung von Salzbrücken. Bei Betrachtung des Rückgrats der beteiligten Sekundärstrukturen und der Konformationen der an der Ausbildung des Dimers und Tetramers beteiligten Aminosäuren, fallen keine Unterschiede zwischen den Ketten der beiden Kristallstrukturen auf.

3 Ergebnisse

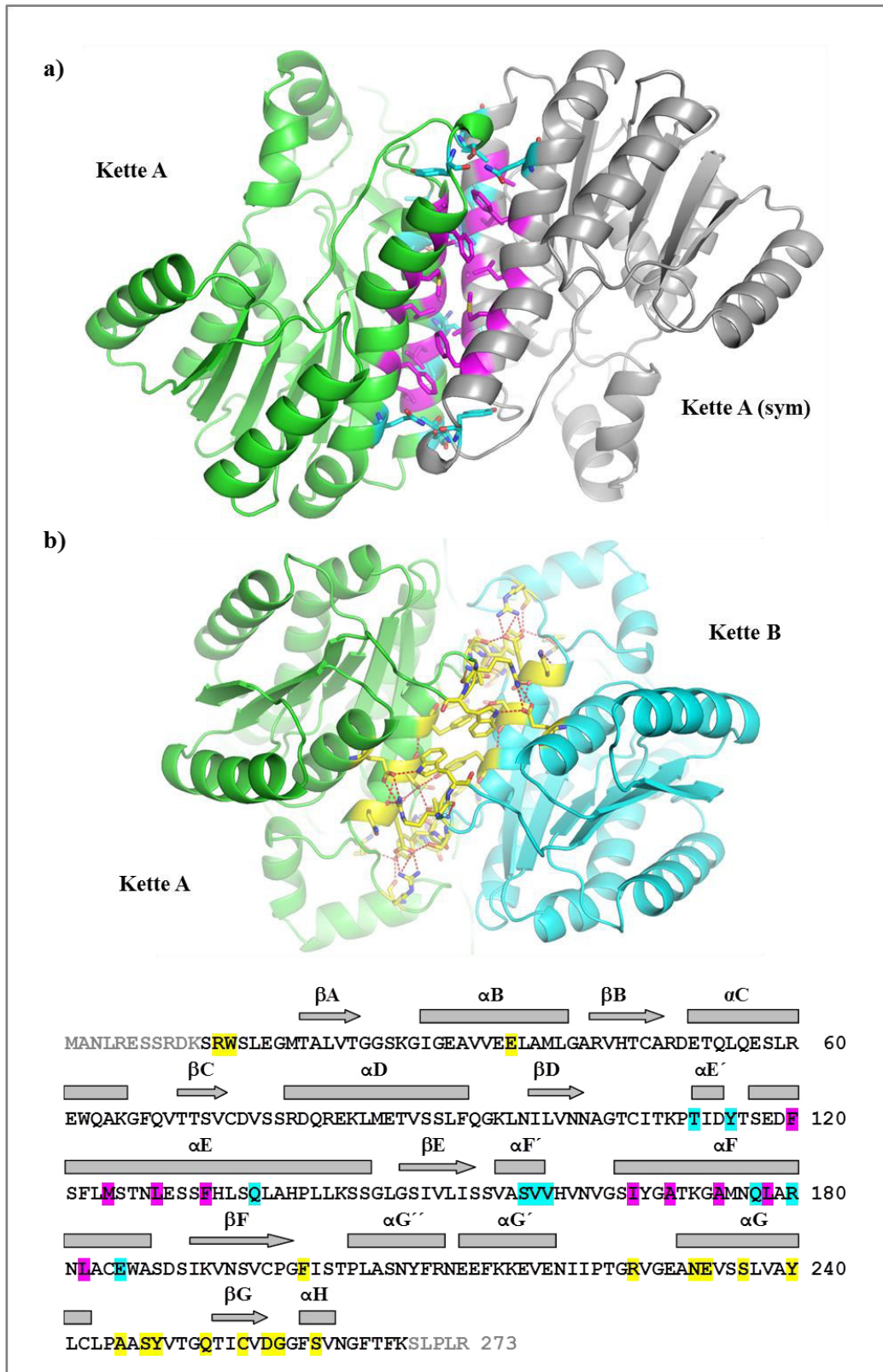


Abb. 3.37: Ausbildung des Dimers zwischen den Ketten A zweier benachbarter asymmetrischer Einheiten (a) und des Tetramers zwischen den Ketten A und B (b). Kristallstruktur B. Hervorgehoben in Struktur und Sequenz: Aminosäuren, die verantwortlich sind für die intermolekularen Wechselwirkungen. a) Dimer: pink: Aminosäuren für die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Helices αE und αF ; hellblau: Aminosäuren für die polare Wechselwirkungen zwischen den Helices $\alpha E'$ und $\alpha F'$. b) Tetramer: gelb: Aminosäuren für polare und ionische Wechselwirkungen. Buchstaben in Sequenz grau: Aminosäuren in Struktur nicht sichtbar.

3 Ergebnisse

3.4.3.2 Cosubstrat- und Substratbindetasche

Die Dichte der Kristallstrukturen zeigte, dass in beiden Fällen NADP^+ cokrystallisiert werden konnte. Innerhalb der Monomere wird das Cosubstrat über 11 Aminosäuren in der Cosubstratbindetasche des Enzyms fixiert (Abb. 3.38).

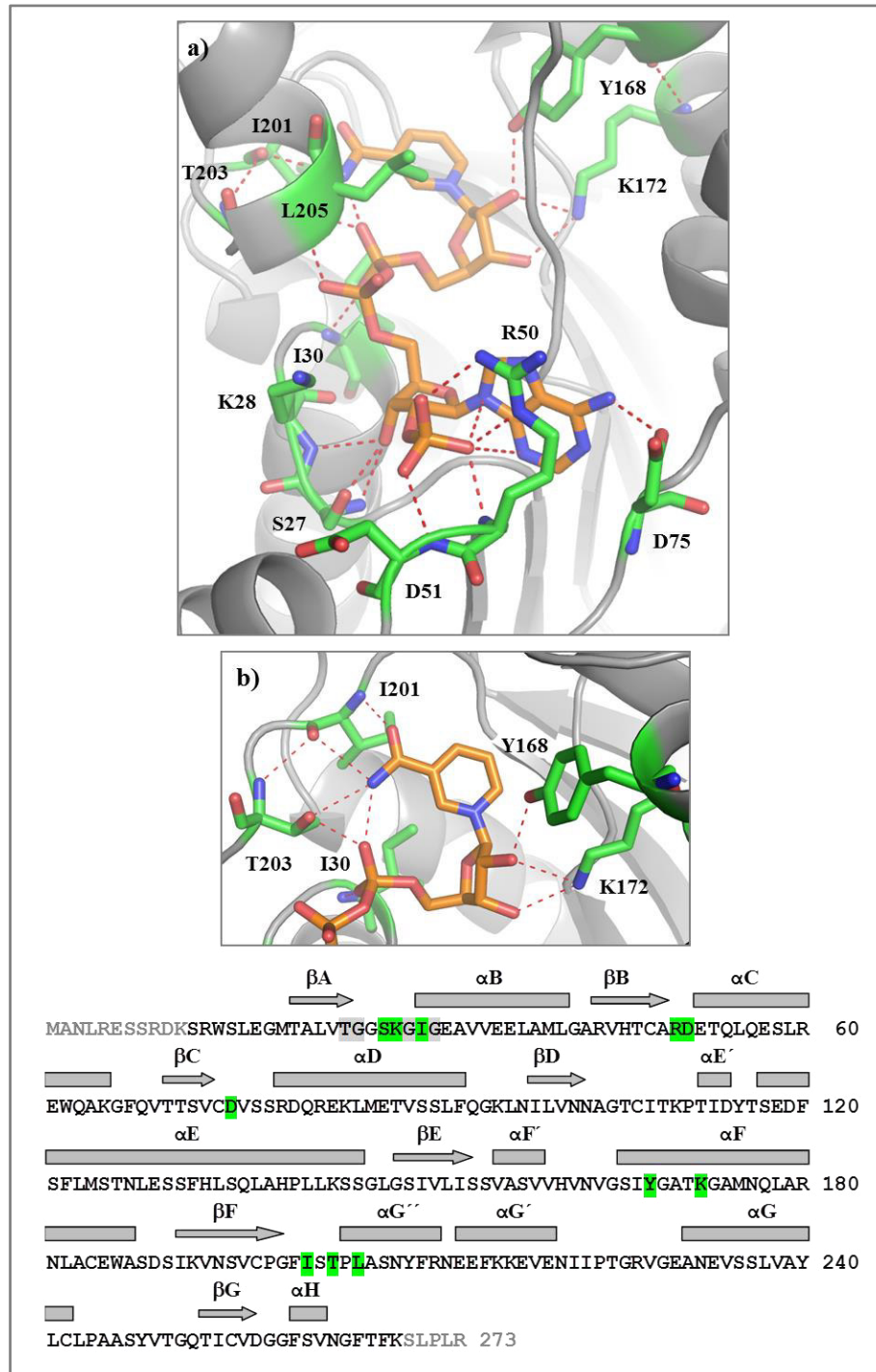


Abb. 3.38: Cosubstratbindung von CoTR. Kristallstruktur B, Kette A. a) Übersicht der Bindung mit Fokus auf die Phosphatgruppe am Adenosin; b) Bindung des Nikotinamidrings. Als Sticks dargestellt: Aminosäuren, die an der Cosubstratbindung beteiligt sind (grün) und NADP^+ (orange); rot gestrichelt: Wasserstoffbrücken. Sequenz: grün: Aminosäuren, die an der Cosubstratbindung beteiligt sind; grau: Glycin-reiches Motiv.

3 Ergebnisse

Wird die Cosubstratbindung im Bereich der Ribose am Adenosin betrachtet, so fällt auf, dass von den zwei basischen Aminosäuren (K28 und R50) in den für die Cosubstratbindung essenziellen Positionen, K28 nur indirekt über das Proton am Amidstickstoffatom der Peptidbindung an der Cosubstratbindung beteiligt ist (Abb. 3.38a). R50 bindet die Phosphatgruppe an der Ribose des Adenosins hingegen über drei Wasserstoffbrücken und trägt so maßgeblich zur Bindung von NADP^+ bei. Ob der Beitrag von K28 zur Cosubstratbindung von Bedeutung für die Aktivität mit beiden Cosubstraten von CoTR ist, konnte über die erhaltenen Kristallstrukturen nicht beurteilt werden. Dafür wäre eine zusätzliche Kristallstruktur von CoTR mit NAD(H) notwendig. Aus diesem Grund wurden Kristallisationsansätze unter den Bedingungen A und B (Tab. 3.13) unter Verwendung von NAD^+ anstelle von NADP^+ angesetzt, jedoch konnte in diesen Ansätzen keine Kristallbildung beobachtet werden (Tab. 6.15, Anhang). Der Vergleich der Ketten zeigte, dass in Kristallstruktur A die Phosphatgruppe an der Adenosinribose über vier statt drei Wasserstoffbindungen vom R50 gebunden wird. Weitere Unterschiede in der Cosubstratbindung konnten nicht festgestellt werden. In der Kristallstruktur ist die Bindung des Cosubstrats an der Nikotinamidribose, vermittelt durch die beiden Aminosäuren Y168 und K172 (Abb. 3.38 und 3.39), gut zu erkennen.

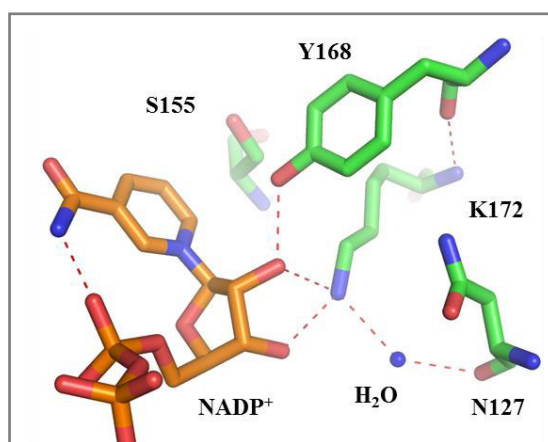


Abb. 3.39: Katalytische Tetrade von CoTR. Kristallstruktur B, Kette A. Grün: Aminosäuren der katalytischen Tetrade; orange: Nikotinamid-Teil von NADP^+ ; blau: Wassermolekül; rot gestrichelt: Wasserstoffbrücken.

Die beiden Aminosäuren gehören zur katalytischen Tetrade und sind somit am postulierten Protonentransfer der Reaktion beteiligt (vergl. Abb. 1.6; Filling et al., 2002). Werden die vier Aminosäuren der katalytischen Tetrade betrachtet (N127, S155, T168, K172; Abb. 3.39), so fallen keine Besonderheiten in der Struktur von CoTR auf, die auf einen abweichenden Mechanismus schließen lassen. Zudem ist in allen Ketten zwischen der Seitenkette von K172 und der Peptidcarbonylfunktion von N127 ein Wassermolekül lokalisiert, wie es für den Protonentransfer beschrieben wurde. Innerhalb der Ketten der beiden Kristallstrukturen können zudem

3 Ergebnisse

keine Unterschiede im Rückgrat oder in der Konformation der vier Aminosäuren gefunden werden (Abb. 3.42 und 3.43).

In Abbildung 3.40 ist die Substratbindetasche von CoTR dargestellt. Bei der Betrachtung der beteiligten Aminosäuren fällt auf, dass es sich überwiegend um hydrophobe Aminosäuren handelt (V156, A157, V162, V164, F200, L205, A206, F210, F215, V219, Ausnahmen: C107 und Y209). Die Aminosäuren bilden zusammen mit Y168 und S155 der katalytischen Tetrade eine vollständig geschlossene molekulare Oberfläche (Abb. 3.40), die nur zum Nikotinamidring hin geöffnet ist und durch diesen begrenzt wird.

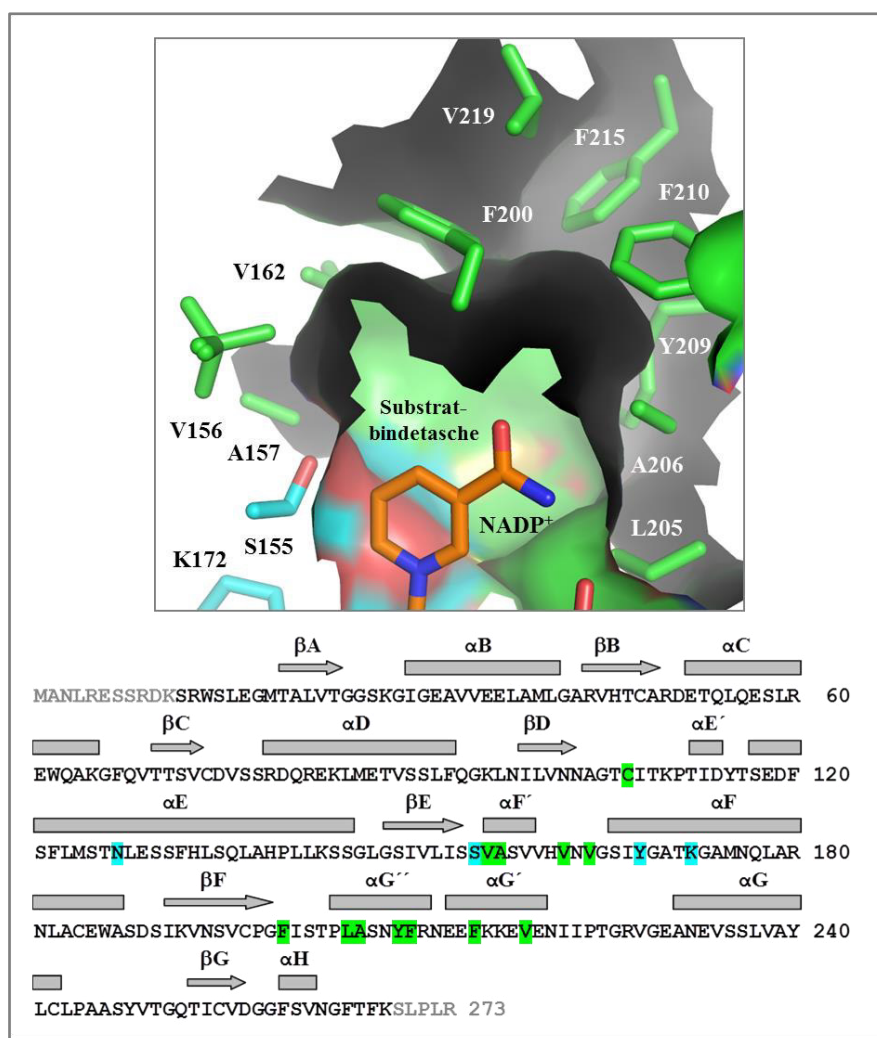


Abb. 3.40: Substratbindetasche von CoTR. Oberflächendarstellung der Substratbindetasche in Kette A (Struktur B) und Aminosäuresequenz von CoTR. Orange: NADP⁺; grün: Aminosäuren, die die Substratbindetasche ausbilden (für Übersichtlichkeit ohne Hauptkette dargestellt); hellblau: Aminosäuren der katalytischen Tetrade. Nicht zu sehen C107, V164, N127 und Y168.

Obwohl die Kristalle für beide Strukturen unter Cokristallisationsbedingungen mit NADP⁺ und (*R*)-WMK erhalten wurden, konnte im Gegensatz zu NADP⁺ in beiden Datensätzen keine Dichte für (*R*)-WMK beobachtet werden. Für Kristallstruktur A zeigte sich im Bereich der

3 Ergebnisse

Substratbindetasche in allen vier Ketten stattdessen Elektronendichte, die einem Acetatmolekül zugeordnet wurde (Abb. 3.41f). Das Acetat ist wie ein Substrat zum S155 und Y168 der katalytischen Tetrade orientiert und stammt aus der Kristallisationslösung (Tab. 3.13). In Struktur B zeigte sich im Bereich der Substratbindetasche in allen vier Ketten ebenfalls eine zusätzliche positive Differenzdichte, die in allen vier Untereinheiten immer gleich orientiert ist (Abb. 3.41a). In Kette C ist zusätzlich ein Übergang der positiven Differenzdichte in die Elektronendichte des Tyrosins (Y168) der katalytischen Tetrade zu sehen, was für eine unmittelbare und sehr kurze Bindung sprechen würde. Die positive Differenzdichte hatte die Form einer planaren Ringstruktur (Abb. 3.41a). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass es sich um ein substituiertes Benzoesäurederivat handeln könnte. Anhand der Form der Dichte wurde ein Ligand ähnlich dem Methyl-2,4-dimethylbenzoat vermutet. Aus der Interpretation als Methyl-2,4-dimethylbenzoat (Abb. 3.41b und d) zeigte sich in der Aufsicht auf die Ringstruktur größtenteils eine gute Übereinstimmung der Form des Liganden, mit der Ausnahme, dass es sich eher um einen Ethylester, als um einen Methylester handeln müsste (Abb. 3.41b und d). Die Ester-Funktion ist dabei zur katalytischen Tetrade orientiert und der aromatische Ring zeigt in die hydrophobe Bindetasche (Abb. 3.41e). Wurde die Ringstruktur jedoch von der Seite betrachtet, so fiel auf, dass der aromatische Ring nicht planar in der Dichte liegt, sondern leicht verdreht (Abb. 3.41c). Diese Beobachtung ließ den Schluss zu, dass es sich entweder nicht um eine aromatische Ringstruktur handelt oder der Ligand in verschiedenen Konformationen bzw. in leicht gedrehten Positionen in der Substratbindetasche vorliegt und die Dichte so das Mittel daraus darstellt.

Da die Dichte im Kristall B keiner Komponente des Lagerpuffers oder der Kristallisationsbedingung zugeordnet werden konnte, wurde vermutet, dass es sich um eine Verbindung aus dem Expressionsorganismus *E. coli* (Rosetta-gami) handeln muss, welche ggf. eine höhere Affinität zur Substratbindetasche hat, als die gestesteten Substrate. Um die unbekannte Verbindung bzw. das Acetat aus der Substratbindetasche während der Cokristallisation zu verdrängen, wurden zusätzliche Kristallisationsexperimente unter verschiedenen Bedingungen mit höheren Substratkonzentrationen (0,5-150 mM) angesetzt (Tab. 6.15, Anhang), die Experimente waren jedoch nicht erfolgreich. Aufgrund des gebundenen Cosubstrats NADP⁺ und der, in der Substratbindetasche befindlichen Liganden (Acetat bzw. größerer unbekannter Ligand), wurde dennoch davon ausgegangen, dass die Kristallstrukturen dem Zustand des ternären Komplexes (Enzym-Cosubstrat-Substrat) entsprachen, weshalb die Diketone alternativ in die Substratbindetasche gedockt wurden (siehe Abschnitt 3.5).

3 Ergebnisse

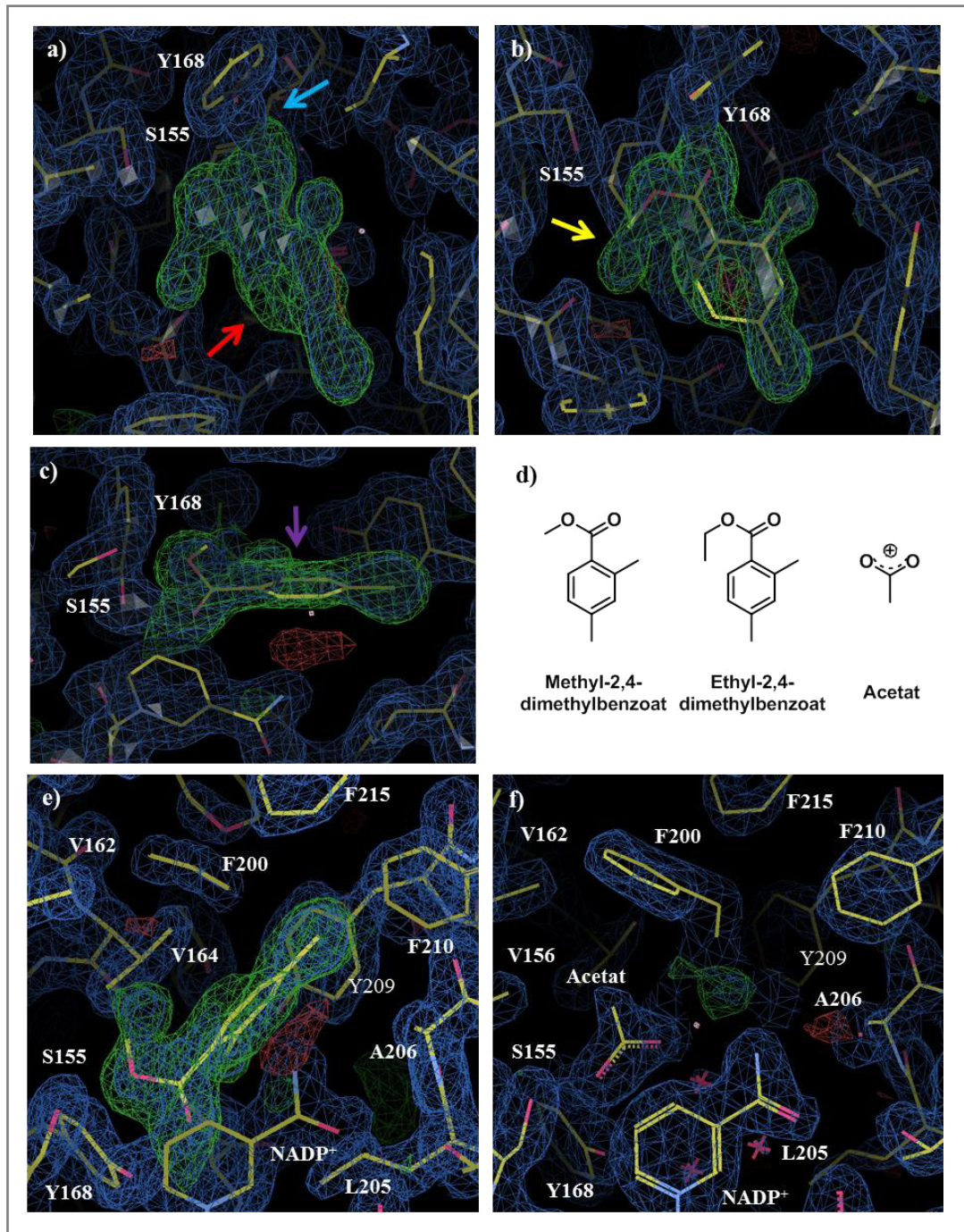


Abbildung 3.41: Liganden im Substratbindebereich der Kristallstrukturen A und B. Struktur B, Kette C (a-c, e): a) Zusätzliche positive F_0 - F_c -Elektronendichte; roter Pfeil: Verweis auf planare Ringstruktur; blauer Pfeil: Übergang in die Dichte des Tyrosins (Y168); b und c) Interpretation der positive F_0 - F_c -Elektronendichte als Methyl-2,4-dimethylbenzoat; gelber Pfeil: Verweis auf zu kurze Methylgruppe; violetter Pfeil: Verweis auf Abweichung von der Planarität; d) Strukturen von Methyl- und Ethyl-2,4-dimethylbenzoat und Acetat. e) Ausrichtung der positiven F_0 - F_c -Elektronendichte in der Substratbinde. f) Positive F_0 - F_c -Elektronendichte in der Substratbinde von Struktur A (Kette B) mit Dichte und Interpretation des Acetats. Blau: $2F_0$ - F_c Dichte, Konturlevel 1,5 σ ; grün: positive F_0 - F_c -Elektronendichte, Konturlevel 3,0 σ ; rot: negative F_0 - F_c -Elektronendichte, Konturlevel -3,0 σ ; gelb: Strukturinterpretation.

In Abbildung 3.42 ist das Strukturalignment der an der Ausbildung der Substratbinde beteiligten Aminosäuren innerhalb der beiden Kristallstrukturen gezeigt.

3 Ergebnisse

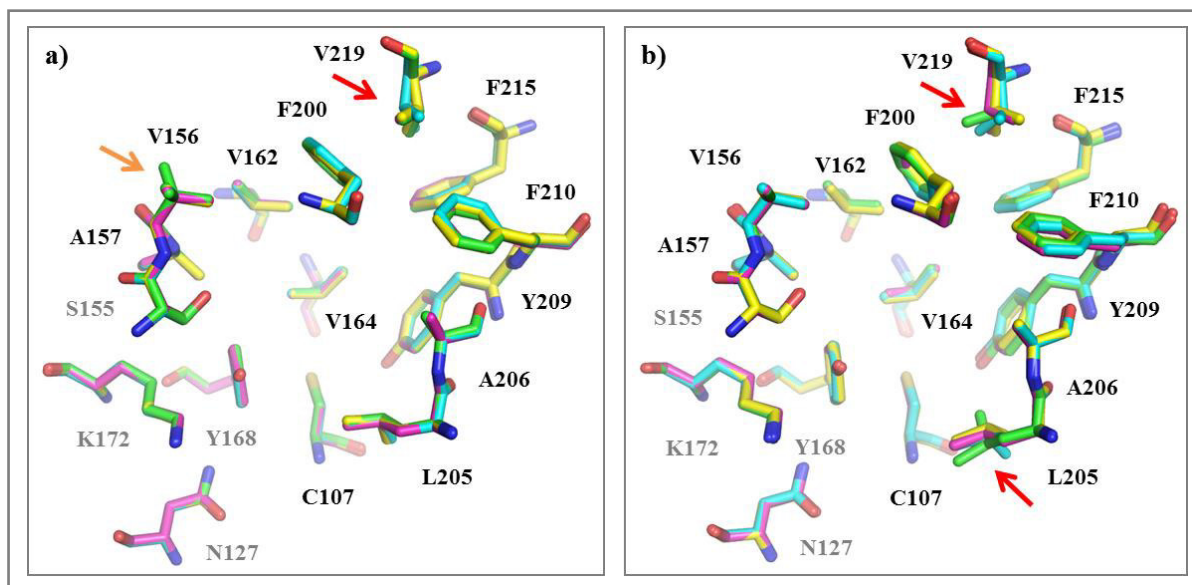


Abb. 3.42: Strukturalignment der Aminosäuren der Substratbindetasche von CoTR. a) Kristallstruktur B, Kette A-D; b) Kristallstruktur A, Kette A-D. Grün: Kette A; hellblau: Kette B; pink: Kette C; gelb: Kette D. Beschriftung in grau: katalytische Tetrade. Pfeile: orange: V156, Kette A (Struktur B), zwei mögliche Konformationen; rot: leichte Unterschiede in den Konformationen der Aminosäuren zwischen den Ketten.

Beim Vergleich der Aminosäuren in den Ketten von Kristallstruktur B (Abb. 3.42a) ist zu sehen, dass in Kette A V156 in zwei Konformationen vorliegt. Eine der möglichen Konformationen ist dabei mit der Konformation in den drei anderen Ketten identisch. In Kette B ist zudem die Seitenkette von V219 entgegengesetzt zu den entsprechenden Seitenketten in den Ketten A, C und D orientiert. In Kristallstruktur A (Abb. 3.42b) liegen die Aminosäuren V219 und L205 in unterschiedlichen Rotameren vor.

Werden die Aminosäuren zwischen den beiden Kristallstrukturen verglichen, fallen vor allem die unterschiedlichen Ausrichtungen von L205 in Struktur A im Vergleich zur einheitlichen Konformation in Struktur B auf und sind möglicherweise auf die Größe und den damit verbundenen Einfluss der gebundenen Liganden auf die Substratbindetasche zurückzuführen (Abb. 3.43a). Die Unterschiede in der Konformation haben zudem eine Auswirkung auf die hydrophobe Oberfläche der Substratbindetasche im Bereich von L205 (Abb. 3.43b-c). So ist die potenzielle Substratbindetasche in Struktur B (Abb. 3.43b) in allen vier Ketten in dem Bereich begrenzter als es in Struktur A der Fall ist (Abb. 3.43c).

Aufgrund der höheren Auflösung und dass der unbekannte Ligand in Kristallstruktur B eine vergleichbare Größe zu den Diketonen aufweist, wurde für das nachfolgende Docking Kristallstruktur B (Kette A) verwendet. In Kette A wurde für V156 die Konformation gewählt, die auch in den anderen Ketten vorlag. Bei dem zusätzlichen Docking mit dem Programm GOLD wird die mögliche konformationelle Flexibilität von L205 berücksichtigt.

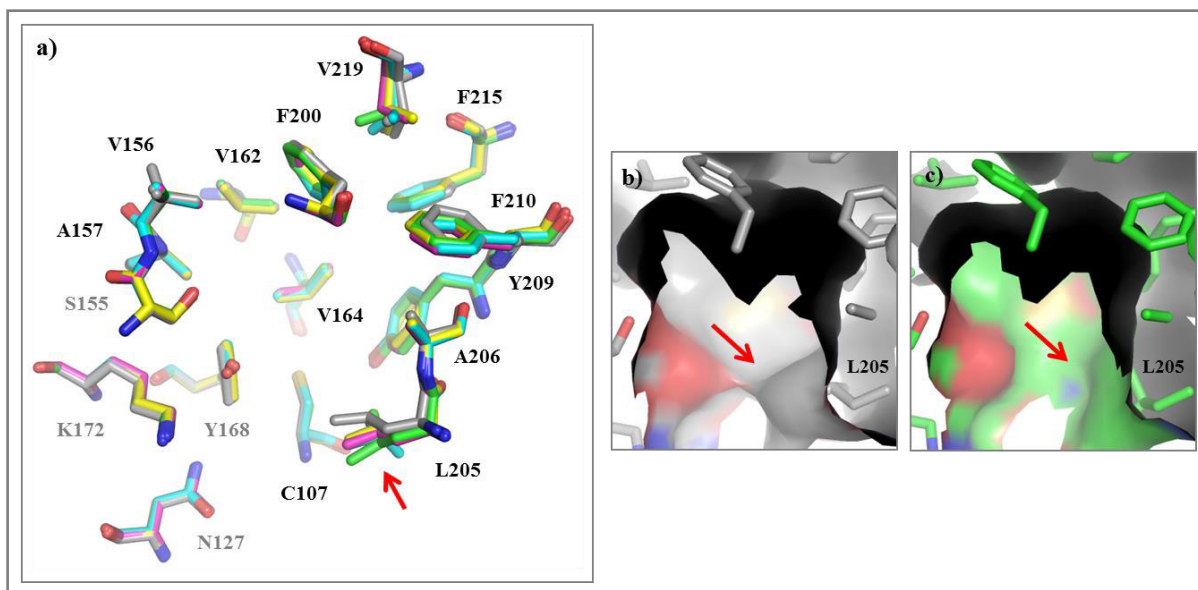


Abb. 3.43: Strukturalignment der Aminosäuren der Substratbindetasche von CoTR und Vergleich der Oberfläche der Substratbindetasche. a) Kristallstruktur A, Kette A-D (grün: Kette A; hellblau: Kette B; pink: Kette C; gelb: Kette D) abgebildet auf Kette A (grau) von Kristallstruktur B. Beschriftung in grau: katalytische Tetrade. b-c) Vergleich der Oberfläche (Aminosäuren ohne Hauptkette): b) Struktur B, Kette A; c) Struktur A, Kette A. Rote Pfeile: Unterschiede in der Konformation von L205 und davon abhängige Ausprägung der Oberfläche.

3.5 Docking der Diketone in die Kristallstruktur von CoTR

Da die Diketone nicht in den Kristallen von CoTR kokristallisiert werden konnten, wurde ihre Bindung in der Substratbindetasche mittels Docking untersucht. Unter Verwendung des Programms MOE erfolgte das Docking in die starre, durch die Kristallstruktur vorgegebene Substratbindetasche. Zusätzlich wurden bei dem Docking mit dem Programm GOLD ausgewählte Seitenketten als flexibel definiert. Wodurch während der Berechnung verschiedene Konformationen getestet werden.

3.5.1 Docking mit MOE

Bei der Auswertung des Dockings mit MOE konnten für das (*R*)-WMK zwei Docking-Posen gefunden werden, aus denen das erhaltene Produkt resultieren würde. Für die weitere Analyse wird jedoch nur auf die Docking-Pose mit dem niedrigsten „Energie refine“-Wert eingegangen, da ein zu hoher „Energie refine“-Wert die zweite Docking-Pose sehr unwahrscheinlich werden lässt (Tab. 3.16). Für (*S*)-WMK und (*R*)-HPK konnte jeweils eine Docking-Pose gefunden werden; für (*S*)-HPK wurde keine Pose ermittelt. Diese Ergebnisse deckten sich mit den Resultaten aus den Aktivitätsassays (Abschnitt 3.3.2), in denen Aktivitäten für alle Diketone mit Ausnahme von (*S*)-HPK gemessen werden konnten.

3 Ergebnisse

Tab. 3.16: Abstand für die Hydridübertragung und die Länge der Wasserstoffbrückenbindungen der Carbonylgruppe zu den Hydroxygruppen von Y168 und S155. Angegeben sind die „Energie refine“-Werte für das Dockings mit MOE und der GOLDscore für das Docking mit GOLD.

MOE-Docking	1. [Å]	2. [Å]	3. [Å]	„Energie refine“
1. (<i>R</i>)-WMK	2,66	1,87	2,84	-1,6889
2. (<i>R</i>)-WMK	2,39	2,12	2,25	20,5352
(<i>S</i>)-WMK	3,26	2,31	3,14	-3,1241
(<i>R</i>)-HPK	2,69	1,79	2,65	-2,8275
GOLD-Docking	1. [Å]	2. [Å]	3. [Å]	GOLDscore
1. (<i>R</i>)-WMK	3,36	1,78	1,52	-45,07
2. (<i>R</i>)-WMK	3,51	2,60	1,58	-44,77
1. (<i>R</i>)-HPK	2,85	1,64	1,68	-47,95
2. (<i>R</i>)-HPK	2,96	1,61	1,56	-47,49

Die drei Posen aus dem Docking mit MOE sind zusammen mit schematischen Darstellungen in Abbildung 3.44 gezeigt. Formal konnte die hydrophobe Bindetasche in drei konvexe Bereiche gegliedert werden (Abb. 3.44a), wobei der Bereich 3 eine ausgeprägtere Tiefe besitzt als die Bereiche 1 und 2. Um diesen Aspekt zu verdeutlichen wird in allen Abbildungen der Dockingergebnisse die molekulare Oberfläche der Substratbindetasche dargestellt. In Kombination mit dem Nikotinamidring bestimmt die Form der drei Bereiche (1-3) die Substratazeptanz und die Produktbildung. Um den Raumspruch der Substrate und die Hydridübertragung zu verdeutlichen sind sowohl die Diketone als auch NADPH mit ihren Wasserstoffatomen dargestellt (H-Atome wurden allgemein für die Berechnungen durch die Programme hinzugefügt). Aminosäuren werden für die Übersichtlichkeit nicht oder weiterhin wie in der Kristallstruktur ohne Wasserstoffatome dargestellt. Die Ermittlungen der Abstände der Hydridübertragung und die Länge der Wasserstoffbrücken erfolgten unter Berücksichtigung der Wasserstoffatome (Tab. 3.16).

Die (*R*)-Enantiomere wurden in den Bereichen 1 und 2 so positioniert, dass es zur Orientierung der sterisch ausladenden Methylgruppe der Diketone in den Bereich 3 kommt, der durch seine ausgeprägtere Tiefe den entsprechenden Platz bietet. Durch diese Ausrichtung der (*R*)-Enantiomere kann sich die Wasserstoffbrücke zu S155 ausbilden, wodurch die Substrate

3 Ergebnisse

in der Substratbindetasche stabilisiert werden. Zudem liegt die Carbonylgruppe dicht neben dem Nikotinamidring und der Hydroxygruppe von Y168, wodurch die Hydridübertragung des 4-pro-S-Hydrids und der Protonentransfer begünstigt werden (Tab. 3.16). Die Hydridübertragung aus dieser Positionierung der (*R*)-Enantiomere erfolgt auf die methylgruppenabgewandte bzw. *Si*-Seite der Carbonylgruppe. Die resultierenden Produkte wären die (*4R,5R*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketone.

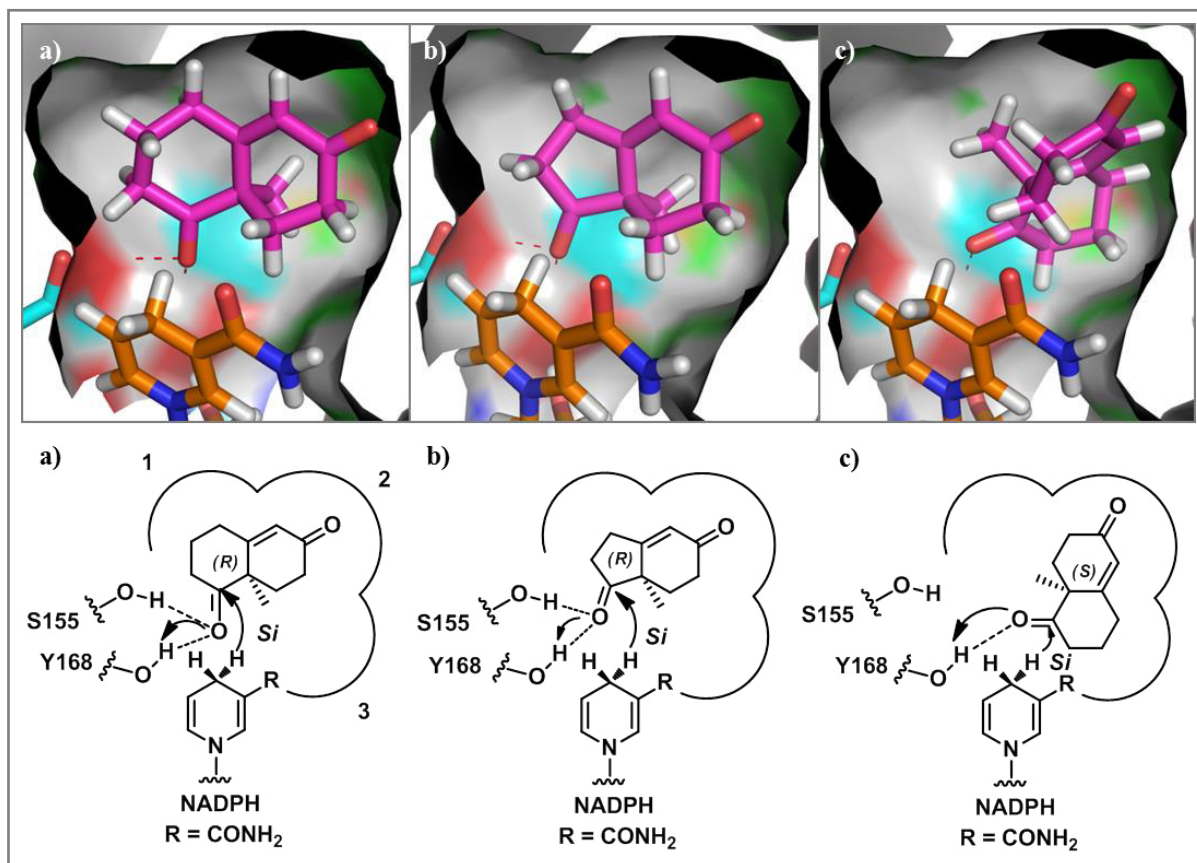


Abb. 3.44: Posen des Dockings mit MOE in der Substratbindetasche von CoTR. Oberfläche dargestellt. Zusätzlich: schematische Darstellungen der Substratorientierung. a) (*R*)-WMK, b) (*R*)-HPK, c) (*S*)-WMK. Orange: NADPH; pink: Substrat; hellblau: S155, Y168 nicht zu sehen. Oberfläche von F200, A205 und F210 ausgeblendet. Rot gestrichelt: Wasserstoffbrücken.

Das (*S*)-WMK war entsprechend dem Docking (Abb. 3.44c) anders in der Substratbindetasche orientiert als die (*R*)-Enantiomere. Damit das (*S*)-WMK an der C5-Carbonylgruppe reduziert werden kann, muss es laut der Docking-Pose in den Bereichen 2 und 3 so orientiert sein, dass die Carbonylgruppe am linken Rand von Bereich 3 positioniert ist. So reicht die Methylgruppe schräg nach hinten in den Bereich 1 und es kommt nicht zu sterischer Hinderung zwischen der Methylgruppe und dem Nikotinamidring. Durch diese Ausrichtung von (*S*)-WMK liegt die Carbonylgruppe des Substrats nicht so dicht neben der katalytischen Tetrade bzw. dem Nikotinamidring, was sich in einer längeren Wasserstoffbrücke zum Y168 und einem

3 Ergebnisse

längeren Abstand für den Hydridtransfer äußert (Tab. 3.16). Der Abstand der Carbonylgruppe zum S155 ist so lang ($>3 \text{ \AA}$), dass wahrscheinlich keine Wasserstoffbrücke zur Stabilisierung des Substrates in der Bindetasche ausgebildet werden kann. Bei Betrachtung der Hydridübertragung für (*S*)-WMK zeigt sich, dass diese erneut auf die *Si*- und methylgruppenabgewandte Seite des Diketons erfolgt und in diesem Fall das resultierende Produkt das (*4S,5S*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketon wäre.

3.5.2 Docking mit GOLD

Anhand der Ergebnisse aus dem Docking mit MOE und die Konformationsunterschiede in Kristallstruktur A und B wurden die vier Aminosäuren F200, L205, Y209 und F210 im Docking mit GOLD in ihrer Konformation als flexibel definiert, da sie auf Grund ihrer Lage, Größe und möglichen Konformationen den größten Einfluss auf die Form der Substratbindetasche haben sollten (Abb. 3.40 und 3.43). Im Docking mit GOLD konnten nur passende Posen für die beiden (*R*)-Enantiomere erhalten werden. Für (*R*)-WMK wurden 25 und für (*R*)-HPK vier Posen gefunden. Wurden die vier für das Docking als flexibel angewählten Aminosäuren F200, L205, Y209 und F210 in den Ergebnissen verglichen, so war für die beiden Aminosäuren F200 und F210 kein Unterschied, auch nicht im Vergleich zur Kristallstruktur, zu sehen. Die beiden anderen Aminosäuren L205 und Y209 zeigten in den GOLD-Ergebnissen für (*R*)-WMK (Abb. 3.45a-b) leicht veränderte Konformationen im Vergleich zu der Kristallstruktur (Abb. 3.45d). Dadurch wurde der Bereich 2 schmaler, und der Bereich 3 wurde nicht mehr so stark nach unten durch das L205 begrenzt, vergleichbar zu Kristallstruktur A (Abb. 3.45c und 3.43b). In allen 25 Docking-Posen lag das gedockte (*R*)-WMK-Molekül daher etwas anders in der Substratbindetasche als im MOE-Ergebnis. Die Unterschiede in den 25 Docking-Posen von (*R*)-WMK waren gering und lagen in den Konformationen der Aminosäuren L205 und Y209 und/oder in der leicht variierten Lage des Diketons und zeigten alle einen schmalen Bereich 2 der Substratbindetasche. Der GOLDScore lag für alle 25 Ergebnisse in derselben Größenordnung (Tab. 3.16). Durch den schmalen Bereich 2 im GOLD-Ergebnis ist (*R*)-WMK zu groß um dieselbe Position wie im MOE-Ergebnis in den Bereichen 1 und 2 einzunehmen (Abb. 3.45d). Aus diesem Grund liegt das Diketon diagonal in den Bereichen 1 und 3 (Abb. 3.45a-c). Die Methylgruppe zeigt auch in dieser Position nach hinten in den Bereich 3. Die geänderte Lage in der Substratbindetasche ändert nichts an der Hydridübertragung des 4-pro-*S*-Hydrids auf die Carbonylgruppe, so erfolgt der nukleophile Angriff ebenfalls von der *Si*- und methylgruppenabgewandten Seite, woraus auch im GOLD-Ergebnis das (*4R,5R*)- α,β -ungesättigte Hydroxyketon resultieren würde.

3 Ergebnisse

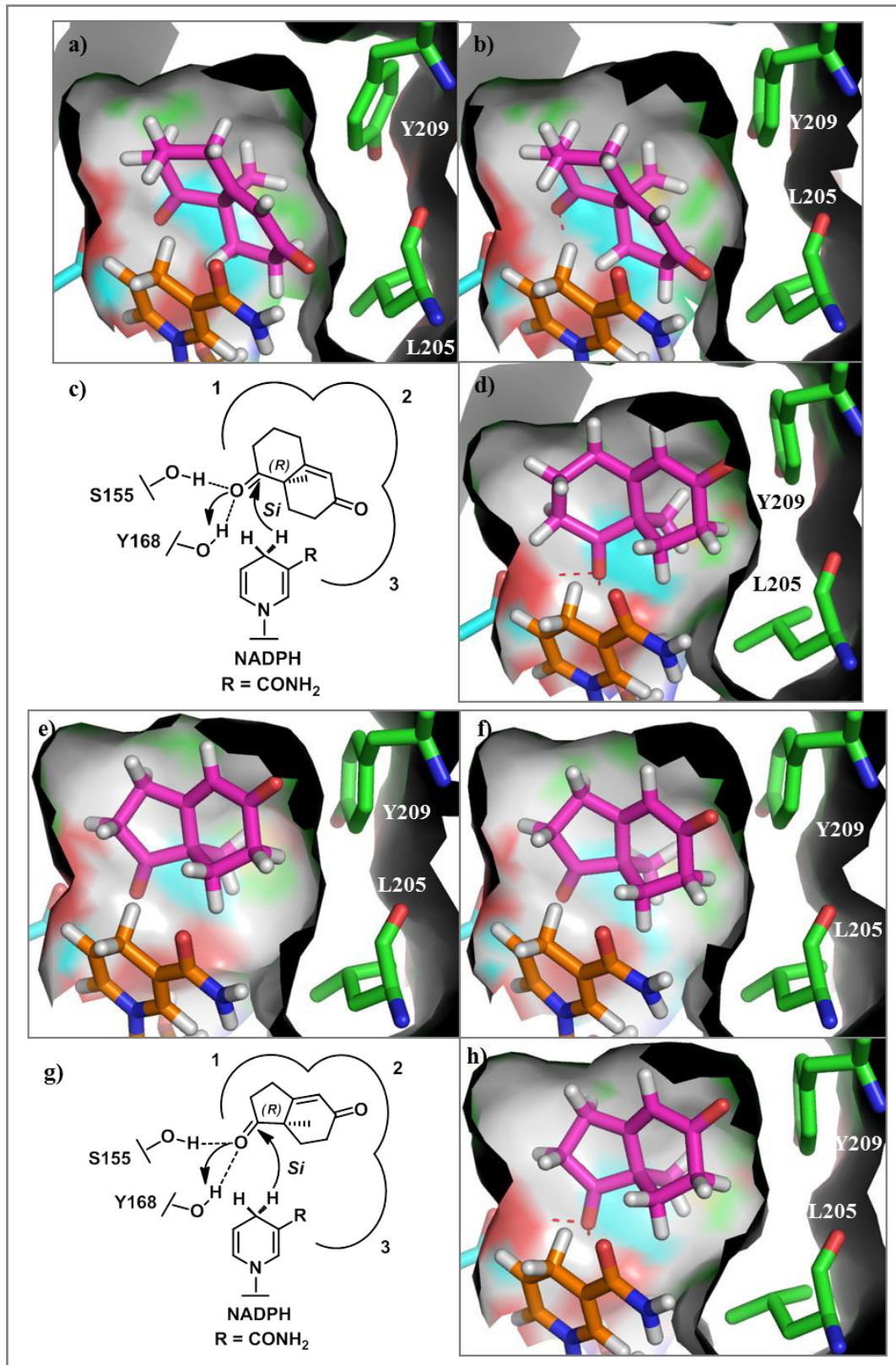


Abb. 3.45: Zwei Posen von *(R)*-WMK und zwei Posen von *(R)*-HPK in der Substratbindetasche von CoTR aus dem Docking mit GOLD. Oberfläche dargestellt. a-b) *(R)*-WMK; e-f) *(R)*-HPK. Zusätzlich: MOE-Ergebnis von *(R)*-WMK (d) und *(R)*-HPK (h) und einer schematischen Darstellung der GOLD-Ergebnisse von *(R)*-WMK (c) und *(R)*-HPK (g). Orange: NADPH; pink: Substrat; grün: relevante Aminosäuren Y209 und L205; hellblau: S155, Y168 nicht zu sehen. Oberfläche von F200, A205 und F210 ausgeblendet. Rot gestrichelt: Wasserstoffbrücken.

3 Ergebnisse

Wurden die GOLD-Ergebnisse für (*R*)-HPK betrachtet, so zeigten auch diese eine kleinere Substratbindetasche im Bereich 2 und eine Vergrößerung des Bereichs 3 nach unten. Da HPK durch den 5-Ring etwas kleiner ist als WMK, wirkte sich die kleinere Bindetasche nicht so stark auf die Docking-Position von HPK aus (Abb. 3.45e, f und g). Im Vergleich zum MOE-Ergebnis (Abb. 3.45h) wurden 2 leicht abweichende Docking-Posen mit GOLD erhalten (Abb. 3.45e und f). Die erste Pose (Abb. 3.45e) entspricht in der Ausrichtung von HPK fast der Pose aus dem MOE-Ergebnis mit dem Unterschied, dass die Carbonylgruppe dichter neben der katalytischen Tetrade liegt und die Wasserstoffbrücken somit kürzer sind. Das Substrat schiebt sich etwas weiter in den Bereich 1 aufgrund des schmalen Bereichs 2. In der zweiten Pose (Abb. 3.45f) wird der 6-Ring etwas in Richtung des Bereichs 3 geneigt, aber nicht so weit wie MWK. Insgesamt wird (*R*)-HPK auch in den GOLD-Ergebnissen so in der Substratbindetasche positioniert, dass das Hydrid von der *Si*- und methylgruppenabgewandten Seite übertragen werden würde und das (*4R,5R*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketon resultiert. Auffällig war, dass im Docking mit GOLD überwiegend viel kürzere Bindungen zur katalytischen Tetrade (vor allem zum S155) und für (*R*)-WMK sehr lange Abstände für die Hydridübertragung im Vergleich zu den MOE-Ergebnissen erhalten wurden (Tab. 3.16). Die schmalere Substratbindetasche im GOLD-Ergebnis könnte zudem ein Grund dafür sein, dass keine Docking-Pose für (*S*)-WMK gefunden wurde.

3.6 Erster Ansatz zur Optimierung der Produktbildung von CoTR und CoTR-(S27A,A49D)

Die Untersuchungen der Produktbildung mit GCMS zeigten für CoTR und CoTR(S27A,-A48D) eine Produktspezifität für die (*4R,5R*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketone (*4R,5R*)-2 und (*4R,5R*)-1 ausgehend von den (*R*)-Enantiomeren von WMK und HPK als Substrate (Abschnitt 3.3.3.4). Zusätzlich zu den Hauptprodukten wurden als Nebenprodukte die (*4R,5S*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketone (*4R,5S*)-2 und (*4R,5S*)-1 erhalten. Um die Bildung der Nebenprodukte zu reduzieren bzw. ganz zu unterdrücken, wurden aus den Dockingstudien und der Kristallstruktur von CoTR mögliche Ansatzpunkte für eine gezielte Optimierung der Substratbindetasche identifiziert.

Die Bildung der Nebenprodukte (*4R,5S*)-2 und (*4R,5S*)-1 könnte zustande kommen, weil sich die Diketone in der Bindetasche gering horizontal drehen können und es so zum nukleophilen Angriff des Hydrids von der *Re*-Seite der Carbonylgruppe kommt. In Abbildung 3.46c ist diese Hypothese schematisch für (*R*)-WMK dargestellt. Ein Protonendonator in der hydrophoben

3 Ergebnisse

Substratbindetasche, der eine Wasserstoffbrücke zur α,β -ungesättigten Carbonylgruppe ausbilden kann, könnte die Drehung reduzieren oder unterbinden. Bei der Betrachtung der MOE- und GOLD-Ergebnisse für (*R*)-WMK und (*R*)-HPK bot sich als mögliche Position das A206 an. Dieses befindet sich am Übergang von Bereich 2 und 3 und somit auf der Seite der Substratbindetasche in welcher die α,β -ungesättigte Carbonylgruppe liegt. Wurde das Alanin manuell (Pymol) durch ein Serin ersetzt, so zeigte sich, dass theoretisch sowohl in dem MOE-Ergebnis als auch in den GOLD-Posen von (*R*)-WMK eine Wasserstoffbrücke ausgehend von S206 zu der α,β -ungesättigten Carbonylgruppe möglich ist (Abb. 3.46a und b). Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 3.46d dargestellt.

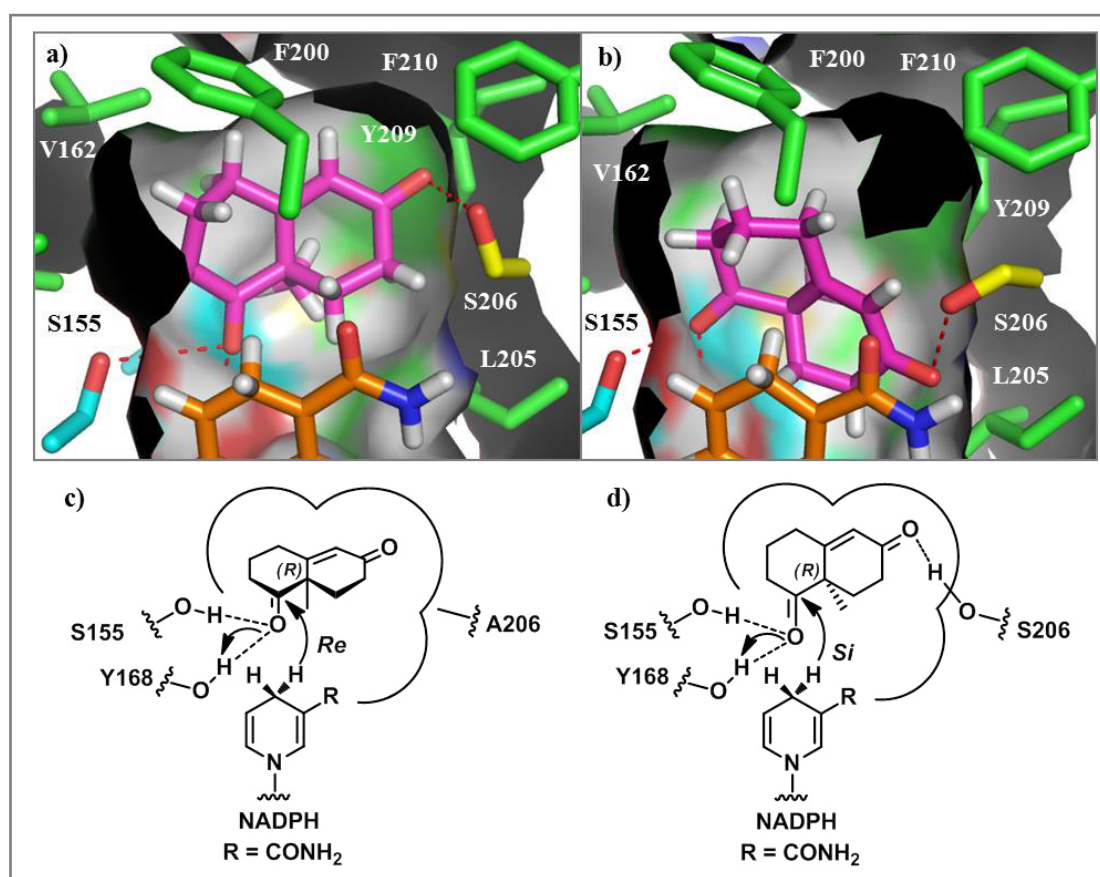


Abb. 3.46: Darstellung der Serinmutante A206S. Im der MOE-Ergebnis von (*R*)-WMK (a) sowie in der zweiten GOLD-Pose von (*R*)-WMK (b). Zusätzlich: schematische Darstellung der Hypothese zur Bildung des (*4R,5S*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketons ausgehend vom (*R*)-WMK (c) und der Substratbindetasche mit der Mutation A206S (d). Orange: NADPH; pink: Substrat; grün: Aminosäuren der Substratbindetasche; hellblau: Aminosäuren der katalytischen Tetrade; gelb: S206. Oberfläche von F200 und S206 ausgeblendet. Rot gestrichelt: Wasserstoffbrücken.

Die Enzymvarianten CoTR(A206S) und CoTR(S27A,A49D,A206S) wurden über Mutagenese-PCR hergestellt, in *E. coli* Rosetta-gami exprimiert und über Metallionenaffinitätschromatographie gereinigt. CoTR(A206S) wies ein pH-Optimum für die Reduktion bei pH 5,5 (KPP) und CoTR(S27A,A49D,A206S) bei pH 5,0 (CPP) auf. Die qualitative Auswertung der

3 Ergebnisse

biokatalytischen Reaktionen mit GCMS (Tab. 6.18, Anhang) ließ erkennen, dass auch für die beiden A206S-Enzymvarianten ausgehend von den (*S*)-Enantiomeren wie für CoTR und CoTR(S27A,A49D) zusätzliche Produkte zu den α,β -ungesättigten Hydroxyketonen gebildet werden (Tab. 3.10 und 3.11). Semiquantitativ zeigte sich für beide A206S-Varianten anhand der geringen Produktbildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone, dass die (*S*)-Enantiomere von WMK und HPK als Substrate ebenfalls nicht bevorzugt sind (Abb. 3.47 und 3.48). Aus den (*R*)-Enantiomeren von WMK und HPK bildeten sowohl CoTR(A206S) mit NADPH als auch CoTR(S27A,A49D,A206S) mit NADH, lediglich die beiden α,β -ungesättigten Hydroxyketone als Produkte (Tab. 6.18, Anhang). Einzig CoTR(S27A,A49D,A206S) mit NADH bildete aus (*R*)-WMK zusätzlich das (*1R,4R,5R*)-Diol.

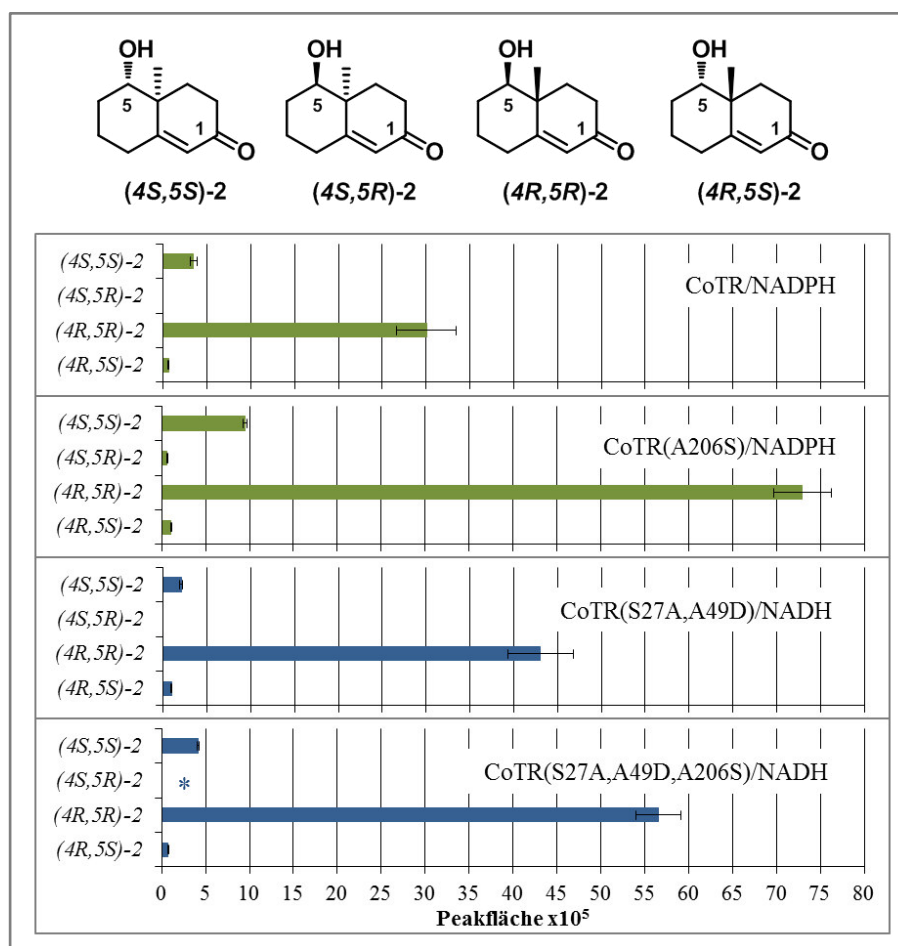


Abb. 3.47: Semiquantitative Auswertung der Bildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone durch CoTR, CoTR(S27A,A49D) und die A206S-Varianten ausgehend von den (*S*)- und (*R*)-Enantiomeren des Wieland-Miescher-Ketons. Ansatzbedingungen: 75 $\mu\text{g/mL}$ (blau) oder 150 $\mu\text{g/mL}$ (grün) Enzym, 1 mM Substrat, 3 mM NAD(P)H, pH-Optima der Enzyme, 3h, 350 rpm, 30 °C. Extraktion mit Essigsäureethylester. Messung: GCMS, drei Wiederholungen mit drei technischen Replikaten ($n = 3$), Angabe der Mittelwerte der Peakflächen mit Standardabweichung. (*) Produkt konnte nachgewiesen werden, lag aber unterhalb des Quantifizierungslimits (LOQ: Signal:Rausch-Verhältnis von >5 , Peakfläche von ≥ 40.000 und maximale prozentuale Standardabweichung von 12%).

3 Ergebnisse

Die semiquantitative Auswertung der biokatalytischen Umsetzungen der (*R*)-Enantiomere von WMK und HPK (Abb. 3.47 und 3.48) zeigte, dass die Bildung der (*4R,5S*)- α,β -ungesättigten Hydroxketone im Vergleich zu der Bildung der (*4R,5R*)- α,β -ungesättigten Hydroxketone verringert war. Für CoTR(A206S) wurde eine prozentuale Peakflächenverteilung von 99%:1% für (*4R,5R*)-2:(*4R,5S*)-2 ausgehend von (*R*)-WMK erhalten. Im Vergleich dazu lag die Verteilung für das Wildtyp-Enzym mit NADPH bei 98%:2%. Dasselbe Ergebnis wurde für CoTR(S27A,A49D,A206S) mit NADH im Vergleich zu CoTR(S27A,A49D) erhalten. Für die α,β -ungesättigten Hydroxketone ausgehend von (*R*)-HPK war die Änderung der Produktverteilung noch ausgeprägter. So änderte sich die Verteilung für (*4R,5R*)-1:(*4R,5S*)-1 für CoTR(A206S) im Vergleich zu CoTR von 76%:24% zu 82%:18% und für CoTR(S27A,A49D,A206S) im Vergleich zu CoTR(S27A,A49D) von 76%:24% zu 88%:12%.

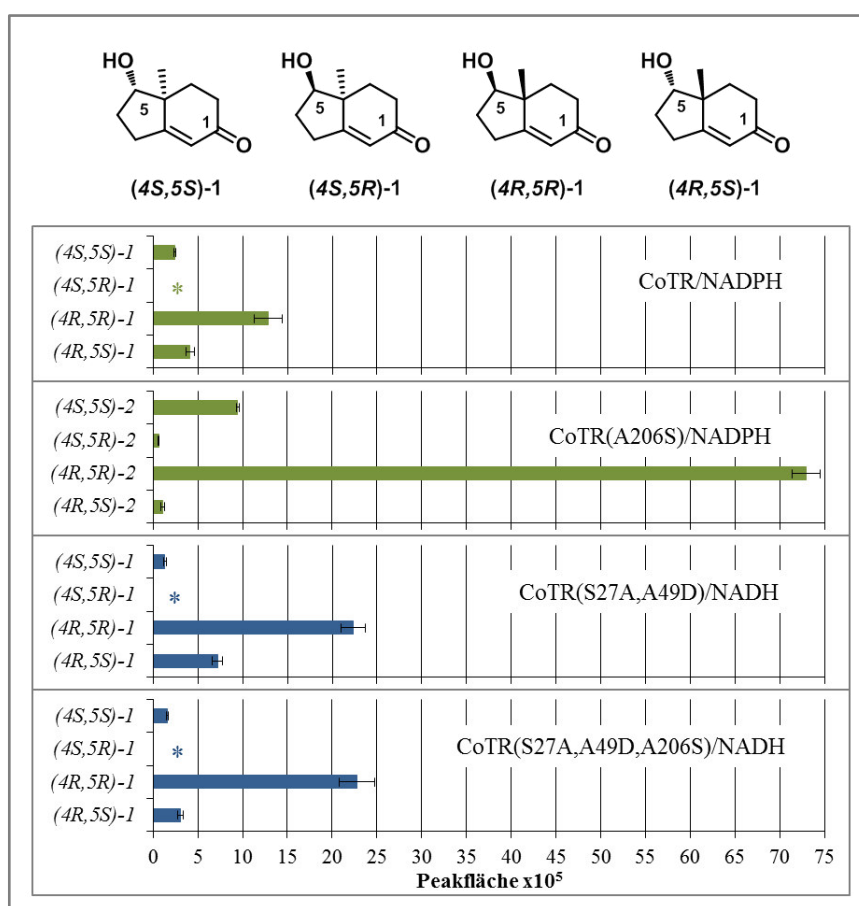


Abb. 3.48: Semiquantitative Auswertung der Bildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone durch CoTR, CoTR(S27A,A49D) und die A206S-Varianten ausgehend von den (*S*)- und (*R*)-Enantiomeren des Hajos-Parrish-Ketons. Ansatzbedingungen: 75 $\mu\text{g/mL}$ (blau) oder 150 $\mu\text{g/mL}$ (grün) Enzym, 1 mM Substrat, 3 mM NAD(P)H, pH-Optima der Enzyme, 3h, 350 rpm, 30 °C. Extraktion mit Essigsäureethylester. Messung: GCMS, drei Wiederholungen mit drei technischen Replikaten ($n = 3$), Angabe der Mittelwerte der Peakflächen mit Standardabweichung. (*) Produkt konnte nachgewiesen werden, lag aber unterhalb des Quantifizierungslimits (LOQ: Signal:Rausch-Verhältnis von >5 , Peakfläche von ≥ 40.000 und maximale prozentuale Standardabweichung von 12%).

4 Diskussion

4.1 Optimierung der Cosubstratpräferenz von SDR-Enzymen

Durch ortsgerichtete Mutagenese konnte in dieser Arbeit auf der Grundlage von Homologie-modellen (Fischer, 2015) die Cosubstratspezifität von At2g29350 von NADPH zu NADH geändert und die Affinität von CoTR für NADH optimiert werden. Dafür waren insgesamt zwei Punktmutationen nötig. Ältere Arbeiten hatten bereits gezeigt, dass sich für die Änderung der Cosubstratpräferenz von dinukleotidbindenden Enzymen vor allem strukturgeleitete, ortsgerichtete Mutagenesestudien eignen (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Arbeiten zur Änderung der Cosubstratpräferenz von NADP(H) zu NAD(H) an kurzkettigen Dehydrogenasen/Reduktasen.

Enzym	Abkürzung	Herkunft	Literatur	Uniprot
Carbonylreduktase	CR	<i>Mus musculus</i>	Nakanishi et al., 1997	P08074
17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1	17 β -HSD1 (17b-HSD1)	<i>Homo sapiens</i>	Huang et al., 2001	P14061
R-spezifische Alkoholdehydrogenase	RADH	<i>Lactobacillus brevis</i>	Schlieben et al., 2005	Q84EX5
Carbonylreduktase	S1	<i>Candida magnoliae</i>	Morikawa et al., 2005	Q9C4B3
17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase	17 β -HSDc1 (17b-HSDc1)	<i>Cochliobolus lunatus</i>	Kristan et al., 2005, Kristan et al., 2007	O93874
Methylglyoxal Reduktase	GRE2P	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Katzberg et al., 2010	Q12068
Alkoholdehydrogenase	RasADH	<i>Ralstonia sp.</i>	Lerchner et al., 2013	C0IR58
Oxidoreduktase	Gox2253	<i>Gluconobacter oxydans</i>	Yin et al., 2014	Q5FNR0
α -Ketosäure Reduktase	A-1R	<i>Sphingomonas sp.</i>	Takase et al., 2014	D6RU56

Die Arbeiten an der Oxidoreduktase Gox2253 (Yin et al., 2014) und der Methylglyoxal Reduktase GRE2P (Katzberg et al., 2010) sind mit den anderen Studien nicht direkt vergleichbar. Die NADPH-abhängige Oxidoreduktase Gox2253 gehört nicht zu den klassischen, sondern zu den verlängerten SDR und besitzt somit andere Schlüsselpositionen für die Cosubstratbindung (Kallberg et al., 2002). Die Methylglyoxal Reduktase GRE2P (Katzberg et al., 2010) weist hingegen kein mit den anderen klassischen SDR vergleichbares Glycin-reiches Motiv (SGxxxFxA statt TGxxxGxG) auf. Abbildung 4.1 zeigt die N-terminalen Sequenzen

4 Diskussion

der übrigen sieben Enzyme im Vergleich zu At2g29350, At2g29360, CoTR und At2g29330. Die Bezeichnung a-d beziehen sich auf die Schlüsselpositionen für die Cosubstratbindung in klassischen SDR (Kallberg et al., 2002). In Tabelle 4.2 sind die kinetischen Daten für die Wildtyp-Enzyme und die erstellten Enzymvarianten zusammengefasst.

Position:		a	
At2g29350	MAK-----EG-GLGENSRWSLGGMTALVTGG	SKGIG	EAVVEELAMLGA-- 42
At2g29360	MAK-----TGESLRDKPRWSLVGMTALVTGG	SKGIG	EAVVEELATLGA-- 43
CoTR	MAN-----LRESSRDKSRWSLEGMTALVTGG	SKGIG	EAVVEELAMLGA-- 43
At2g29330	MDK-----RWSLQGLTALVTGGASG	IGHAI	VEELAGFGA-- 34
CR	MKL-----NFSGLRALVTGAGKGI	GRD	TVKALHASGA-- 32
17b-HSD1	MAR-----TVVLI	TGCS	SIGLHLAVRLASDPSQS 30
RADH	MSN-----RLDGKVAIITGG	TGIG	LAIATKFEVEGA-- 32
S1	MAKNFSNVEYPAPPPAHTKNESLQVLDL	FKLNG	KVASITGSSSGIGYALAEFAQVGA-- 58
17b-HSDc1	MPH-----VENASETYIPGR	LDGK	VALVTGSGRIGAAVAVHLGRLGA-- 43
RasADH	MYR-----LLNKTAVITGG	NSG	IGLATAKRFVAEGA-- 31
A1-R	MFP-----DLKGRVLI	TGSSQ	GIGLATARLFARAGA-- 32
A1-R'	MFS-----DLKGRILITG	STEG	GIGMATATELARYGA-- 32
		Loop S	
Position:	bcd		
At2g29350	-KVHTCARD	ETQL---	QERLREWQAKGFQVTTSVCDVSSRDQVKLMETVSSLYQGKLN 98
At2g29360	-RIHTCARD	ETQL---	QESLRKWQAKGFQVTTSVCDVSSRDKREKLMETVSTIFEGKLN 99
CoTR	-RVHTCARD	ETQL---	QESLREWQAKGFQVTTSVCDVSSRDQREKLMETVSSLFQGKLN 99
At2g29330	-KIHVCDI	SKTLL---	NQSLSEWEKKGQVSGVCDASNLERETLMQTVTTFDFGKLN 88
CR	-KVVAVTR	TNSDL---	VSLAKECP---GIEPVCVDLGDWDATEKALGGI----GPVDL 79
17b-HSD1	FKVYATLR	DLKTQ	GRLWEAARALACPPGSLETLQLDVRDSKVAARERVTE---GRVDV 87
RADH	-KVMI	TGRHSD	VG---EKAASKVGTDP-QIQFFQHDSSDEDGWTKLDFDAEKAF-GPVST 86
S1	-DVAI	WNSH	DATGKAEALAKKYGV---KVKAYKANVSSSDAVKQTIEQQIKDF-GHLDI 113
17b-HSDc1	-KVVVNY	ANSTK	D---AEKVVSEIKALGSDAIAIKADIRQVPEIVKLFDAQVAHF-GHLDI 99
RasADH	-YVFI	VGRRK	EL---EQAAAEIGR---NVTAVKADVTKLEDLDRLYAIVREQR-GSIDV 83
A1-R	-KVGL	HGRK	APAN---IDETIASMRADGGDAAFFAADLATSEACQQLVDEFVAKF-GGIDV 88
A1-R'	-VVGL	NSHVD	PAD---PALLLGKLR
		AGDGA	FFRADITKTAECQRLVSAFVERF-DGIDV 88
		Loop I	
At2g29350	LVN	NVG--	TSIFKP--TTEYTAEDFSFVMATNLES
At2g29360	LVN	NVG--	TCIVKP--TLQHTAEDFSFMTATNLES
CoTR	LVN	NAG--	TCITKP--TIDYTS
At2g29330	LVN	NVG--	TIRTKP--TIEYEAEDFSFLISTNLES
CR	LVN	NAA--	LIVIMQP--FLEV
17b-HSD1	LVC	NAG--	LGLLGP--LEALGEDAVASVLDVNVVGT
RADH	LVN	NAG--	IAVNKS--VEETTTAEWRKLLAVNLDG
S1	VVA	NAG--	IPWTKGAYIDQDDDKHFQVVDVLDK
17b-HSDc1	AVS	NSG--	VVSFGH--LKDVT
RasADH	LF	NSG--	AIEQKT--LEEITPEHYDRTFD
A1-R	LIN	NAG	GLVGRKP--LPEIDDTFYDAVMDANIRSV
A1-R'	LIN	NAG	GLAGRSN--LENIDDAFYDRVMDLNG

Abb. 4.1: Multiples Alignment (Embl-Ebi; MAS/MAFFT) der N-terminalen Sequenzen (Cosubstratbindebereich) der TRL aus *A. thaliana* At2g29350, At2g29360, At2g29330 und CoTR mit den klassischen SDR aus Tabelle 4.1. Grau: konservierte Motive; gelb: Positionen der Punktmutationen; hellblau: ausgetauschte Loop-Bereiche. Die Positionen a-d entsprechen denen aus der Arbeit von Y. KALLBERG (2002) zur Einordnung der klassischen SDR. A-1R': α -Ketosäure Reduktase, A0A075B5H4.

Ein Vergleich der Studien an den klassischen SDR mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit zeigt, dass die Einführung der sauren Aminosäure am Ende des zweiten β -Faltblattes unerlässlich für die Änderung der Cosubstratpräferenz von NADP(H) zu NAD(H) ist, der erzielte Effekt jedoch stark variiert (vergl.: CR(T38D), 17 β -HSD1(L36D), RADH(G37D), 17 β -HSDc1(Y49D), und RasADH(G37D)). In At2g29350 wurde dieser Befund durch das zusätz-

4 Diskussion

liche cosubstratabhängige Dimer-Tetramer-Gleichgewicht besonders deutlich. Durch die Einführung des Aspartats (At2g29350(A48D)) verlor das Enzym seine Aktivität mit NADPH, zeigte jedoch auch nur eine sehr geringe spezifische Aktivität mit NADH (Tab. 3.1). Erst durch die Mutation S26A wurde eine deutliche Aktivität mit NADH erhalten.

Tab. 4.2: Kinetische Parameter der Wildtyp-Enzyme (WT) und Enzymvarianten mit veränderter Cosubstratpräferenz. At2g29350, CoTR sowie die klassischen SDR aus Tabelle 4.1. 1) Reinhardt, 2014; 2) Nakanishi et al., 1997; 3) Huang et al., 2001; 4) Schlieben et al., 2005; 5) Morikawa et al., 2005; 6) Kristan et al., 2007; 7) Lerchner et al., 2013; 8) Takase et al., 2014. Zu 8) ausgetauschter Loop rund um Position a (ex_S) und rund um Position b-c (ex_L), beide Loops ausgetauscht (ex_W); vergl. Abbildung 4.1. (*) maximale spezifische Aktivität von $52,9 \pm 0,9$ nkat/mg bei 0,8 mM NADH, pH 7,5. (**) Die Nummerierung der Mutationsstellen erfolgt in der Veröffentlichung ohne Berücksichtigung des Start-Methionins; n. d., nicht detektierbar.

Wildtyp-Enzym und Varianten	Cosubstrat	K_m [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$]
WT-At2g29350 ¹⁾	NADPH	$30,1 \pm 2,6$	1,06	0,035
WT-At2g29350 ¹⁾	NADH	-	-	-
S26A,A48D	NADPH	-	-	-
S26A,A48D*	NADH	n. d.	n. d.	n. d.
WT-CoTR ¹⁾	NADPH	$78,3 \pm 7,9$	1,01	0,013
WT-CoTR ¹⁾	NADH	$666,5 \pm 20,0$	11,76	0,018
A49D	NADPH	$454,9 \pm 63,4$	$5,44 \pm 0,36$	0,012
A49D	NADH	$239,8 \pm 19,6$	$7,84 \pm 0,24$	0,032
S27A,A49D	NADPH	$609,0 \pm 89,3$	$5,44 \pm 0,43$	0,009
S27A,A49D	NADH	$119,5 \pm 12,7$	$7,31 \pm 0,22$	0,061
WT-CR ²⁾	NADPH	1,1	1,2	1,1
WT-CR ²⁾	NADH	65	1,8	0,027
T38D ²⁾	NADPH	220	2,3	0,011
T38D ²⁾	NADH	9,7	3,3	0,34
WT-17 β -HSD1 ³⁾	NADPH	$0,9 \pm 0,04$	$2,2 \pm 0,07$	2,4
WT-17 β -HSD1 ³⁾	NADH	$6,0 \pm 0,9$	$3,8 \pm 1,0$	0,6
L36D ^{3)**}	NADPH	257 ± 10	$5,1 \pm 0,3$	0,02
L36D ^{3)**}	NADH	$15,7 \pm 1,4$	$1,2 \pm 0,07$	0,07
WT-RADH ⁴⁾	NADP ⁺	$15 \pm 0,4$	$4,4 \pm 0,1$	0,29
WT-RADH ⁴⁾	NAD ⁺	-	-	-
G37D ⁴⁾	NADP ⁺	9100 ± 1500	$5,9 \pm 1,0$	0,0007
G37D ⁴⁾	NAD ⁺	750 ± 70	$9,9 \pm 0,9$	0,0132

4 Diskussion

Fortsetzung Tab. 4.2

Wildtyp-Enzym und Varianten	Cosubstrat	K_m [μM]	k_{cat} [s⁻¹]	k_{cat}/K_m [s⁻¹μM⁻¹]
WT-S1 ⁵⁾	NADPH	16,7	870	52,1
WT-S1 ⁵⁾	NADH	-	-	-
S41A,S42A,S43Q,W63I, Y64D,N65I,S66N ⁵⁾	NADPH	-	-	-
S41A,S42A,S43Q,W63I, Y64D,N65I,S66N ⁵⁾	NADH	160	64	0,4
S41A,S42A,S43R,W63I, Y64D,N65I,S66N ⁵⁾	NADPH	-	-	-
S41A,S42A,S43R,W63I, Y64D,N65I,S66N ⁵⁾	NADH	62	120	1,9
WT-17β-HSDcl ⁶⁾	NADPH	6,5	3,8	0,59
WT-17β-HSDcl ⁶⁾	NADH	-	-	-
Y49D ⁶⁾	NADPH	160	0,065	0,0004
Y49D ⁶⁾	NADH	860	0,27	0,0003
WT-RasADH ⁷⁾	NADP ⁺	51 ± 4	1,650 ± 0,033	0,032
WT-RasADH ⁷⁾	NAD ⁺	3100 ± 300	0,0217 ± 0,0017	0,0000069
G37D ⁷⁾	NADP ⁺	2300 ± 500	0,0025 ± 0,0002	0,0000011
G37D ⁷⁾	NAD ⁺	2300 ± 200	0,0383 ± 0,0033	0,000017
N15G,G37D,R38V,R39S ⁷⁾	NADP ⁺	280 ± 120	0,000028 ± 0,000003	0,0000001
N15G,G37D,R38V,R39S ⁷⁾	NAD ⁺	1100 ± 100	0,080 ± 0,005	0,000073
N15G,G37D,R38V,R39S, A86N,S88A ⁷⁾	NADP ⁺	n. d.	n. d.	n. d.
N15G,G37D,R38V,R39S, A86N,S88A ⁷⁾	NAD ⁺	800 ± 100	0,0300 ± 0,002	0,000038
WT-A-1R ⁸⁾	NADPH	9,55 ± 1,4	220 ± 7,1	23,0
WT-A-1R ⁸⁾	NADH	192 ± 75	25,3 ± 5,7	0,13
A-1R_ex_S ⁸⁾	NADPH	512 ± 70	193 ± 18	0,38
A-1R_ex_S ⁸⁾	NADH	623 ± 100	3,77 ± 0,47	0,006
A-1R_ex_L ⁸⁾	NADPH	n. d.	n. d.	n. d.
A-1R_ex_L ⁸⁾	NADH	321 ± 240	4,25 ± 2,0	0,013
A-1R_ex_W ⁸⁾	NADPH	5600 ± 8600	2,03 ± 3,0	0,0004
A-1R_ex_W ⁸⁾	NADH	2580 ± 1400	6,80 ± 3,5	0,003

Vergleichbare Ergebnisse wurde für die analogen Varianten At2g29360(A49D), At2g29360-(S27A,A49D), CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) der verwandten TRL At2g29360 und

4 Diskussion

CoTR erhalten (Tab. 3.2 und 3.3). So wurde für At2g29360 anhand der spezifischen Aktivität gezeigt, dass At2g29360(S27A,A49D) eine höhere Aktivität mit NADH aufweist als At2g29360(A49D). Für CoTR konnte die NADH-Affinität durch den zusätzlichen Austausch S27A gegenüber CoTR(A49D) weiter gesteigert werden. Die Betrachtung der Cosubstratbindetasche in der CoTR-Kristallstruktur stärkt die Annahme, dass die Einführung eines Aspartats in Sequenzposition 49 zu sterischer Hinderung und/oder elektrostatischer Abstoßung mit S27 führt (Abb. 4.2).

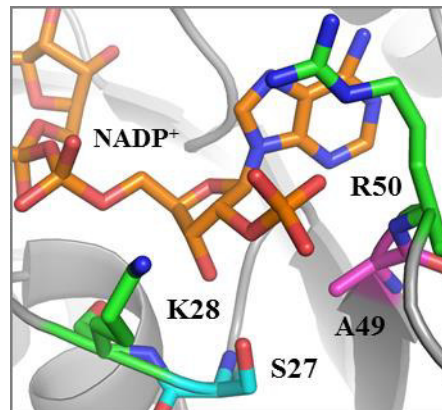


Abb. 4.2: Ausschnitt der N-terminalen Cosubstratbinderegion von CoTR. Kristallstruktur B, Kette A. Orange: NADP⁺; grün: basische Aminosäuren; hellblau: S27; pink: A49 → wird zu D49 substituiert.

Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit den Enzymvarianten RasADH(N15G,G37D,-R38V,R39S), S1(S41A,S42A,S43Q,W63I,Y64D,N65I,S66N) und S1(S41A,S42A,S43R,-W63I,Y64D,N65I,S66N), in denen neben dem Aspartat (G37D und Y64D) auch eine kleine Aminosäure (N15G, S42A) im Glycin-reichen Motiv in der analogen Position zur S26A von At2g29350 bzw. S27A von CoTR und At2g29360 eingefügt wurde. Da RasADH(N15G,-G37D,R38V,R39S) im Vergleich zu RasADH(G37D) eine höhere Affinität zu NAD⁺ zeigte, wären zum Vergleich mit At2g29350 die kinetischen Daten für RasADH(N15G,G37D) sowie zusätzlich die Enzymvarianten S1(Y64D) und S1(S42A,Y64D) interessant gewesen, um nur den Effekt der beiden analogen Mutationen aus dieser Arbeit vergleichen zu können. Jedoch wurden die entsprechenden Varianten von RasADH und S1 nicht untersucht und/oder publiziert (Lerchner et al., 2013; Morikawa et al., 2005). Ein zusätzlicher Austausch der basischen Aminosäuren (K27S und R49I) in At2g29350 bewirkte allgemein eine Verschlechterung bzw. den Verlust der spezifischen Aktivität (Tab. 3.1). Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit RasADH(N15G,G37D,R38V,R39S), in der die basische, für die NADP⁺-Bindung verantwortliche Aminosäure R38 (analog zu R49I) durch ein unpolares Valin ersetzt wurde. In wie weit die höhere Affinität zu NAD⁺ dieser Enzymvarianten im Vergleich zu RasADH(G37D) der Mutation R38V zu verdanken ist, kann jedoch nicht gesagt werden. Werden hingegen die Ergebnis-

4 Diskussion

se von At2g29350 mit den Enzymen S1(S41A,S42A,S43Q,W63I,Y64D,N65I,S66N) und S1(S41A,S42A,S43R,W63I,Y64D,N65I,S66N) verglichen, so fällt auf, dass durch die Einführung der basischen Aminosäure in Position 43 (analog zu K27 in At2g29350) im Vergleich zu der Variante mit Q43 die Affinität zu NADH gesteigert war (Tab. 4.2). Somit wies die Enzymvariante mit der basischen Aminosäure eine höhere Affinität und einen höheren k_{cat} -Wert auf als die Variante mit Asparagin. Analog dazu zeigte At2g29350(S26A,A48D) eine wesentlich höhere spezifische Aktivität als At2g29350(S26A,K27S,A48D) (vergl. Tab. 3.1). Somit scheint es in diesen Fällen wichtig zu sein, die basische Aminosäure im Glycin-reichen Motiv zu belassen oder einzuführen. In RasADH wich das in den klassischen SDR eigentlich stark konservierte Motiv NNAG zur Stabilisierung des zentralen β -Faltblattes ab (FN₅SG, Abb. 4.1). Aus diesem Grund wurde zusätzlich RasADH(N15G,G37D,R38V,R39S,A86N,S88A) hergestellt. Das Enzym wies zwar eine höhere Affinität zu NAD⁺ auf, besaß aber allgemein keine verbesserten katalytischen Eigenschaften gegenüber RasADH(N15G,G37D,R38V,R39S). Da das Motiv NNAG in At2g29350 ebenfalls abweicht (NNVG), wurde zur Optimierung der Aktivität mit NADH die Enzymvariante At2g29350(S26A,A48D,V103A) hergestellt, welche jedoch keine Aktivität zeigte (Tab. 3.1). Die Enzymvariante At2g29350(V103A) wies hingegen eine deutlich höhere spezifische Aktivität mit NADPH als das Wildtyp-Enzym auf (Tab. 3.1). Die sigmoiden Kurvenverläufe bei den kinetischen Messungen der Enzymvariante offenbaren jedoch auch ein stärker auf der Seite des Dimers liegendes Gleichgewicht als für das Wildtyp-Enzym (Abb. 3.10c).

Allgemein zeigten die Studien an den ausgewählten TRL aus *A. thaliana* sowie CoTR, dass die Einführung der sauren Aminosäure für eine zufriedenstellende Änderung der Cosubstratpräferenz nicht ausreicht, sondern dass zusätzlich auch das Serin innerhalb des Glycin-reichen Motivs, welches sich strukturell in unmittelbarer Nähe zum Aspartat befindet, durch ein kleines unpolares Alanin ausgetauscht werden muss. Angesichts dieser übereinstimmenden Resultate ist zu fragen, ob die zusätzliche Einführung der kleinen Aminosäure von allgemeiner Bedeutung für die Änderung der Cosubstratspezifität klassischer SDR ist. In Abbildung 4.3 sind im Vergleich zu At2g29330 die N-terminalen Sequenzen von 20 klassischen SDR aus Pflanzen, Tieren und Bakterien dargestellt, die eindeutig als NADH-präferierende Proteine charakterisiert wurden. Das Alignment zeigt, dass neben dem konservierten Aspartat am Ende des zweiten β -Faltblattes in der relevanten Position im Glycin-reichen Motiv bevorzugt eine kleine, unpolare Aminosäure auftritt. Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Einführung einer kleinen, unpolaren Aminosäure im Glycin-reichen Motiv, neben der Ein-

4 Diskussion

führung der sauren Aminosäure, einen allgemein wichtigen Ansatzpunkt für die Änderung der Cosubstratpräferenz klassischer SDR von NADP(H) zu NAD(H) darstellt.

At2g29330	----- MDKRWSLQGLTALV TGGASGIGHAIVEELAGFGAKI-HVCDISKT----	44
ABA2	MSTNTESSSYSLPSQRLLGKVALITGGATGIGESIVRLFHKHGAKV-CIVDLQDD----	55
ISPD	-----MASVKKLAGKVAIVTGGASGIGEVTFARLFAERGARAIVADMQPE----	45
ZSD1	-----MRLEGKVALVTGGASGIGESIARLFIEHGAKI-CIVDVQDE----	40
HSD17B8	-----MASQLQNRLRSALALVTGAGSGIGRAVSVRLAGEGATV-AACDLDR-----	46
17bHSD10	-----MAAACRSVKGLVAIVTGGASGLGLATAERLVGQGASA-VLLDLPNS----	45
15-PGDH	-----MHVNGKVALVTGAAQGGIGRAFAEALLKKGAKV-ALVDWNLE----	40
DHRS6	-----MGRLDGKVIILTAAAQGGIGQAAALAFAREGAKV-IATDINES----	41
Ke 6	-----MASQLRRLRSALALVTGAGSGIGRAISVRLAEGAAV-AACDLGDA----	44
rHADH	-----MAAAVRSVKGLVAIVTGGASGLGLSTAKRLVGGQATA-VLLDVPNS----	45
ADH	-----MSFTLTNKNVIFVAGLGGIGLDTSKELLKRD LKNLVILDR IEN----	43
HSD 28	-----MSIIVISGCATGIGAAATRKVLEAAGHQI-VGIDIRDA----	36
3b/17b-HSD	-----MTNRLQGKVALVTGAGSGVGLVVKLLLGEGAKV-AFSDINEA----	42
L-BDH	-----MSKVAMVTGGAQGGIGRGISEKLAADGFDI-AVADLPQQ----	37
CDH	-----MARVEGQVALITGAARGQGRSHAIKLAEEGADV-ILVDVPNDVVDI----	45
SDH	-----MRLDGKTALITGSARGIGRAFAEAYVREGARV-AIADINLE----	40
GatDH	-----MDYRTVFRLDGACAAVTGAAGSGLGLEICRAFAASGARI-ILIDREAA----	46
meso-BDH	-----MKKVALVTGAGQGGIGKATLRLVKDGFVAV-AIADYNDA----	37
3a/20b-HSD	-----MNDLSGKTVIITGGARGLGAEARQAVAAGARV-VLADVLDE----	41
7b-HSDH	-----MFNSDNLRLDGKCAIITGACAGIGKEIATTFATAGASV-VVSDINAD----	46
KduD	-----MILSAFSLEGKVAIVTGC DTGLGQGMALGLAQAGCDI-VGINIVEP----	45

Abb. 4.3: Multiples Alignment (Embl-Ebi: MAS/Clustal Omega) der N-terminalen Sequenz von At2g29330 aus *A. thaliana* mit den N-terminalen Sequenzen von NADH-abhängigen klassischen SDR aus Pflanzen, Tieren und Bakterien. Abkürzung, Enzymaktivität (Uniprot-Code). **Pflanzen:** ABA2, Xanthoxin Dehydrogenase (Q9C826); ISPD, (-)-trans-Isopiperitenol Dehydrogenase (Q5C919); ZSD1, Zerumbon-Synthase (F1SWA0); **Tiere:** HSD17B8, 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 8 (Q92506); 17bHSD10, 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 10 (Q99714); 15-PGDH, 15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase (P15428); DHRS6, R- β -Hydroxybutyrat Dehydrogenase (Q9BUT1); Ke 6, 17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 8 (P50171); rHADH II/ABAD, 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Typ2/Amyloid- β bindende Alkoholdehydrogenase (O70351); ADH, Alkoholdehydrogenase (P00334); **Bakterien:** HSD 28, 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase (P80702); 3b/17b-HSD, 3 β /17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (P19871); L-BDH, L-2,3-Butandiol Dehydrogenase (Q9ZNN8); CDH, Carveol Dehydrogenase (Q9RA05); SDH, Sorbitol Dehydrogenase (Q59787); GatDH, Galactitol 2-dehydrogenase (C0KTJ6); meso-BDH, 2,3-Butandiol Dehydrogenase (Q48436); 3a/20b-HSD, 3 α /20 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (P19992); 7b-HSDH, 7 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (P0AET8); KduD, 2-Dehydro-3-deoxy-D-gluconat 5-Dehydrogenase (P37769). Grau: Glycin-reiches Motiv; grün: basische Aminosäuren; pink: saure Aminosäure; rot: kleine Aminosäuren im Glycin-reichen Motiv. Die genauen Angaben der Organismen und der relevanten Literatur sind in Tabelle 6.4 im Anhang zusammengefasst.

4.2 Dimer-Tetramer-Gleichgewicht von At2g29350(S26A,A48D) und At2g29350

Bei den Messungen der spezifischen Aktivität von At2g29350(S26A,A48D) zeigte sich, dass die Enzymvariante bis zu einer NADH-Konzentration von 0,8 mM nicht mit Cosubstrat gesättigt werden konnte. Die Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Cosubstratkonzentration wies zudem keinen hyperbolischen Kurvenverlauf entsprechend dem Modell von Michaelis und Menten (1913) auf, sondern einen sigmoiden Kurvenverlauf. Sigmoide Kurvenverläufe lassen häufig auf ein kooperatives Verhalten entsprechend dem Modell von Hill (1910) schließen. Dieses Verhalten ist bekannt für oligomere Enzyme und ist mit einer Konformationsänderung innerhalb der Enzyme abhängig von der Substratkonzentration verbun-

4 Diskussion

den. Um zu überprüfen, ob sich der Oligomerisierungszustand in Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen ändert, wurde mittels analytischer Ultrazentrifugation das native Molekulargewicht für das Wildtyp-Enzym und At2g29350(S26A,A48D) bestimmt. Für beide Proteine offenbarte die Messung ein enzymkonzentrationsabhängiges Dimer-Tetramer-Gleichgewicht. Anhand des Gleichgewichts konnte jedoch nicht rückgeschlossen werden, ob die sigmoiden Kurvenverläufe aus einer substrat- und/oder cosubstratabhängige Konformationsänderung in weiteren Untereinheiten in einem festen oligomeren Zustand resultieren oder ob sich der Oligomerisierungszustand abhängig von der Substrat- und/oder Cosubstratkonzentration ändert. Um diese Frage beantworten zu können, wurden At2g29350(S26A,A48D) und At2g29350 mittels Gelfiltration untersucht (Abschnitt 3.1.4.5). Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Methode durch die indirekte Detektion über SDS-PAGE keine Absolutwerte liefern konnte, wurden die Ergebnisse für At2g29350(S26A,A48D) wie folgt interpretiert: Der Oligomerisierungszustand des Enzyms wird durch die Cosubstratkonzentration beeinflusst. Die alleinige Bindung des Cosubstrats ist maßgeblich an der Ausbildung des Tetramers beteiligt, wozu das Substrat in Sättigung allein nicht in der Lage ist. Diese Beobachtung folgt dem publizierten bi-bi-Mechanismus der SDR, in dem das Cosubstrat zuerst gebunden wird (Beispiele: Nakanishi et al. 1997; Sahni-Arya et al., 2007). Allerdings erscheint die Cosubstratkonzentration von 3,5 mM NADH immer noch nicht auszureichend, um das Gleichgewicht vollständig auf die Seite des Tetramers zu verschieben. Die Messung unter hohen Substrat- und Cosubstratbedingungen zeigte, dass der aktive Zustand von At2g29350(S26A,A48D) in Sättigung das Tetramer ist und dass der sigmoide Verlauf der Enzymkinetik durch das cosubstratabhängige Dimer-Tetramer-Gleichgewicht zustande kommt. Die Messungen geben keinen Aufschluss über die Aktivität des Dimers. So könnte es sein, dass das Dimer inaktiv ist und die geringe Aktivität bei niedriger Cosubstratkonzentration durch die geringe Menge des Tetramers zustande kommt. Andererseits könnte das Enzym in seiner dimeren Konformation eine sehr geringe Aktivität aufweisen. Die sigmoiden Verläufe der Enzymkinetiken abhängig von der Substratkonzentration resultieren vermutlich daraus, dass das Enzym nicht soweit mit Cosubstrat gesättigt war, um das Gleichgewicht weit genug auf die Seite des aktiven Tetramers zu verschieben. Da bei den Messungen keine Cosubstrat-Sättigung erzielt wurde, konnten keine kinetischen Parameter berechnet werden. Die erhaltenen Kurvenverläufe wurden demzufolge nur als Abhängigkeit der spezifischen Aktivität von der Cosubstrat- und Substratkonzentrationen unter den jeweils gewählten Bedingungen interpretiert. Für das Wildtyp-Enzym At2g29350 zeigten die Messungen, dass der Oligomerisierungszustand ebenfalls von der Cosubstratkonzentration abhängt. Wie in der mutierten Variante war auch für das Wildtyp-

4 Diskussion

Enzym das Tetramer der aktivste Zustand. Im Vergleich zu At2g29350(S26A,A48D) wurde im Wildtyp-Enzym die Bildung des aktiven Tetramers bereits bei geringen Cosubstratkonzentrationen ausgelöst, sodass die kinetischen Messungen in der Tetramer-Form erfolgten und das Dimer-Tetramer-Gleichgewicht keinen Einfluss auf die Kurvenverläufe hatte. Somit konnten für das Wildtyp-Enzym die kinetischen Parameter nach dem Modell von Michaelis und Menten (1913) ermittelt werden.

Auch wenn die Änderung der Cosubstratspezifität von NADPH zu NADH für At2g29350 erfolgreich war, so stellt das cosubstrat- und enzymkonzentrationsabhängige Dimer-Tetramer-Gleichgewicht der Enzymvariante At2g29350(S26A,A48D) ein Problem für die Anwendung dar. Denn entweder müssten Cosubstratkonzentrationen von weit über 0,8 mM NADH eingesetzt werden, um die Enzymvariante mit Cosubstrat zu sättigen und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erhalten, oder es müsste bei Cosubstratkonzentrationen von unter 0,8 mM NADH mit geringen Umsätzen oder längeren Reaktionszeiten für eine hohe Umsetzung gerechnet werden. Für eine erfolgreiche Anwendung wäre es also nötig, das Gleichgewicht in Richtung des Tetramers zu verschieben. Fraglich war jedoch, wodurch das Dimer-Tetramer-Gleichgewicht von At2g29350 zustande kommt, da es sowohl von der Enzym- als auch von der Cosubstratkonzentration abhängt. Ausgehend von dem Befund, dass es bei gleichbleibender Enzymkonzentration durch die Erhöhung der Cosubstratkonzentration zur Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung Tetramer kam, lag die Vermutung nahe, dass es durch die Bindung des Cosubstrats zu einer Veränderung innerhalb der Proteinstruktur kommt, welche die Ausbildung des Tetramers begünstigt. Ein erster Ansatz, um diese Annahme zu testen, waren Chimären aus At2g29350 und der für die Cosubstratbindung wichtigen N-terminalen Sequenz von CoTR (Abschnitt 3.2). Da CoTR als stabiles Tetramer vorlag, sollte diese Chimärenbildung die Struktur von At2g29350 dahingehend ändern, dass der tetramere Zustand unabhängig von der Enzym- oder Cosubstratkonzentration bevorzugt wird. Zusätzlich sollte durch die gezielte Einführung der sauren Aminosäure (D49) am Ende des zweiten β -Faltblattes und der kleinen Aminosäure (A27) innerhalb des Glycin-reichen Motivs eine optimierte Form von At2g29350(S26A,A48D) erhalten werden. Die Chimären und Enzymvarianten waren gut exprimierbar, löslich und aktiv, führten jedoch nicht zum gewünschten Ziel, da sie wie At2g29350 ein Gleichgewicht zwischen Dimer und Tetramer zeigten. In der Literatur konnte für die Änderung der Cosubstratpräferenz nur eine Arbeit gefunden werden, die den Austausch größerer Sequenzabschnitte beinhaltet. In der Publikation von R. TAKASE (2014) wurden die Proteinsequenzen (Sequenzidentität 64%) der beiden mit NADH/NADPH aktiven α -Ketosäure Reduktasen A1-R (höhere Affinität zu NADPH) und A1-R' (höhere Affinität zu

4 Diskussion

NADH) verglichen und anhand der Kristallstruktur von A1-R' die beiden Loop-Bereiche S und L, welche die für die Cosubstratspezifität wichtigen Aminosäure beinhalten, definiert (Abb. 4.1). Durch den einzelnen und kombinierten Austausch der Loop-Bereiche S und L in A1-R durch A1-R' ließ sich die Affinität zu NADH im Vergleich zum Wildtyp-Enzym jedoch nicht verbessern (Tab. 4.2). Auffällig an der Sequenz von A1-R' war, dass am Ende des zweiten β -Faltblattes keine saure Aminosäure zu finden war. Wurden im Vergleich die Loop-Bereiche von A1-R' durch die von A1-R ersetzt, so erhöhte sich die NADPH-Affinität und die katalytische Effizienz mit NADPH im Vergleich zum Wildtyp-Enzym stark. Somit zeigt diese Arbeit, dass der Austausch größerer Sequenzabschnitte grundsätzlich zielführend sein kann.

Wird die Kristallstruktur von CoTR betrachtet, fällt auf, dass der Loop zwischen β F und α G', durch den der Nikotinamidring des NADP^+ gebunden wird, sehr dicht neben dem Loop zwischen α G'' und α G, welcher an der Interaktion zum Tetramer beteiligt ist, liegt (Abb. 4.4a). Wenn At2g29350 eine ähnliche dreidimensionale Struktur aufweist wie CoTR, ist es denkbar, dass die Bindung des Cosubstrats zu einer strukturellen Veränderung im Bereich des Loops zwischen β F und α G' führt, die wiederum einen Effekt auf den Loop zwischen α G'' und α G hat, wodurch die Ausbildung des Tetramers abhängig vom Cosubstrat beeinflusst wird. In Abbildung 4.4 sind zudem die Sequenzen von CoTR und At2g29350 im Zusammenhang mit den für die Ausbildung des Tetramers in der CoTR verantwortlichen Aminosäuren (polare und ionische Wechselwirkungen) wiedergegeben. Der direkte Vergleich der Aminosäuresequenzen zeigt, dass sich von den 17 relevanten Aminosäuren in den beiden Enzymen nur fünf (Y200, P234, F238, S243, T259) unterscheiden. Bei genauer Betrachtung der Kristallstruktur von CoTR fällt auf, dass die beiden Aminosäuren S236 (At2g29350: P234) und Y240 (At2g29350: F238), die in den α G-Helices lokalisiert sind, zwei markante Wasserstoffbrücken ausbilden, welche über α G die Dimere zum Tetramer verbinden (Abb. 4.4). Unter der Annahme, dass At2g29350 eine ähnliche dreidimensionale Struktur in dem Bereich der α G-Helices aufweist, können diese Wasserstoffbrücken zwischen den analogen Aminosäuren P234 und F238 nicht ausgebildet werden, wodurch das Tetramer weniger stabil wäre als in CoTR. Dieser Mangel an Stabilität bei der Ausbildung des Tetramers von At2g29350 könnte durch erhöhte Enzymkonzentration überwunden werden. Dies würde die Abhängigkeit der Tetramerbildung von der Enzymkonzentration bei At2g29350 erklären.

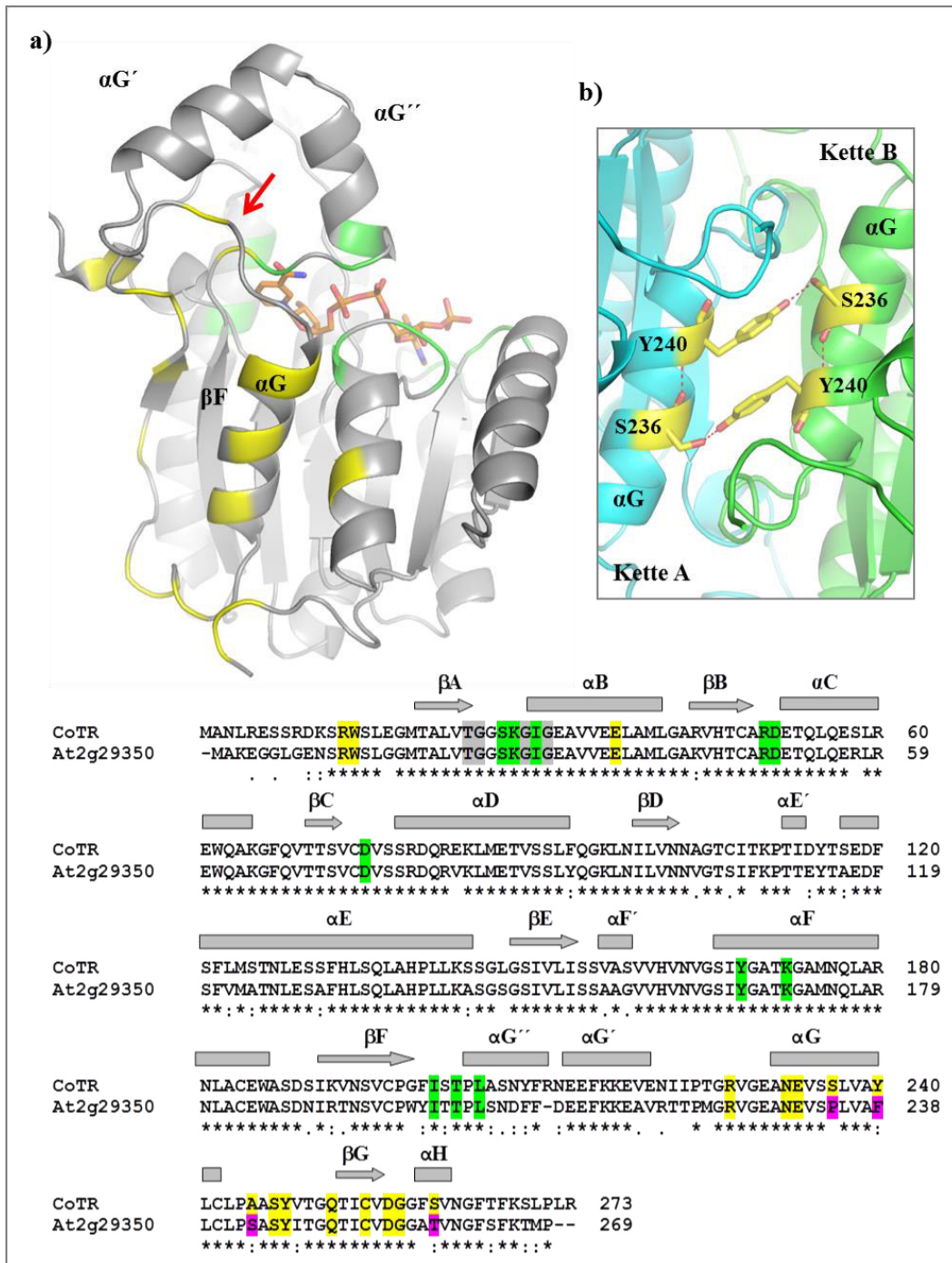


Abb. 4.4: Hypothesen zum Dimer-Tetramer-Gleichgewicht von At2g29350 unter Berücksichtigung der Kristallstruktur und Sequenz von CoTR. (a) Struktur von CoTR (Kette A, Struktur B), mit Sicht auf den C-terminalen Bereich. Grün: Positionen der cosubstratbindenden Aminosäuren; gelb: Positionen der Aminosäuren, die an der Bildung des Tetramers beteiligt sind; orange: NADP⁺. Roter Pfeil: Strukturelle Nähe der Loop-Bereiche (zwischen βF und αG'' sowie αG' und αG). b) Wasserstoffbrücken (rot gestrichelt) zwischen Y240 und S236 (gelb) zwischen den Kette A (hellblau) und B (grün) zur Ausbildung des Tetramers. Alignment: gelb: Aminosäuren in CoTR, die für die Ausbildung des Tetramers verantwortlich sind; pink: Unterschiede in den Aminosäuren zwischen At2g29350 und CoTR; grün: Aminosäuren in CoTR, die für die Bindung des Cosubstrats verantwortlich sind.

Auf Basis dieser Beobachtung bietet sich die Untersuchung weiterer Chimären aus CoTR und At2g29350 an. Anhand der CoTR-Kristallstruktur könnte ein Austausch der C-terminalen

4 Diskussion

Sequenz von At2g29350 durch die entsprechende Sequenz der CoTR erfolgen, der nicht die Substratbindetasche, sondern nur die für die Bildung des Tetramers verantwortliche Sequenz umfasst. Dadurch könnte gegebenenfalls die Ausbildung des Tetramers für At2g29350 optimiert werden. Allgemein wären, um der Frage der Strukturänderung durch die Cosubstratbindung zu beantworten und damit At2g29350 gezielter zu optimieren, Kristallstrukturen von At2g29350 oder At2g23950(S26A,A48D) als Apoenzym und im binären Komplex mit NADP(H) bzw. NAD(H) wünschenswert. Die Kristallstruktur von At2g29350 konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht erhalten werden.

4.3 SDR-katalysierte Reduktion bityklischer Diketone

Die Testassays zeigten, dass At2g29350 und CoTR und ihre NADH-präferierenden Enzymvarianten At2g29350(S26A,A48D) und CoTR(S27A,A49D) sowohl das Wieland-Miescher-Keton (WMK) als auch das Hajos-Parrish-Keton (HPK) reduzieren. At2g29350 und At2g29350(S26A,A48D) wiesen dabei eine Bevorzugung der (*S*)-Enantiomere der beiden Diketone auf, wohingegen CoTR und CoTR(S27A,A49D) die (*R*)-Enantiomere bevorzugten. Die Untersuchung der Produktbildung mittels GCMS zeigte, dass alle Enzyme selektiv die Carbonylgruppe an C5 reduzieren. Ein Blick auf die Stereochemie der Produkte offenbarte, dass durch At2g29350 und At2g29350(S26A,A48D) spezifisch die entsprechenden (*4S,5S*)-Produkte und durch CoTR und CoTR(S27A,A49D) die entsprechenden (*4R,5R*)-Hydroxyketone als Hauptprodukte gebildet werden (Abb. 4.5).

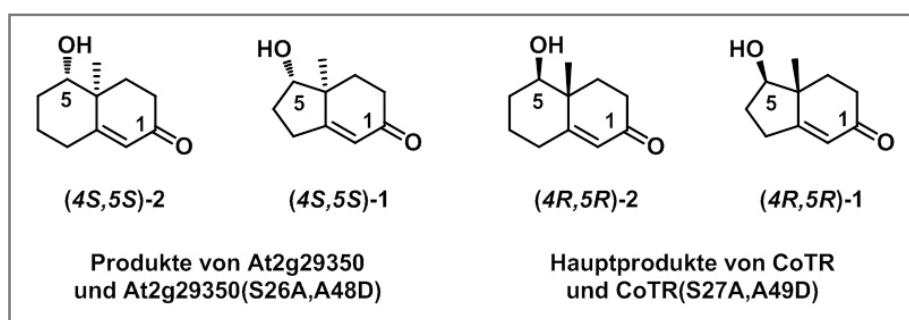


Abb. 4.5: (Haupt-)produkte der biokatalytischen Reduktion der (*S*)- bzw. (*R*)-Enantiomere des Wieland-Miescher- bzw. Hajos-Parrish-Ketons durch At2g29350 und CoTR sowie ihrer NADH-präferierenden Enzymvarianten.

Unter dem Aspekt der Anwendbarkeit wäre keine andere Produktbildung wünschenswerter gewesen, da durch die Proteine dieselben Produkte gebildet wurden wie unter der Verwendung von NaBH₄. Somit ist ein Austausch der chemisch synthetischen durch die biokatalytische Variante möglich. Der Ersatz durch die Enzyme bietet sich nicht nur an, weil NaBH₄ giftig ist und bei Kontakt mit Wasser hochentzündliche Gase freisetzt, sondern auch, weil so

4 Diskussion

auf die aufwendige Kühlung und die saure Aufarbeitung verzichtet werden kann. Beispiele für die chemische Synthese von Natur- und Wirkstoffen und ihrer Derivate oder Kernstrukturen ausgehend von den beiden Enantiomeren von WMK und HPK über die $(4S,5S)$ - bzw. $(4R,5R)$ - α,β -ungesättigten Hydroxyketone sind in Abbildung 4.6 und in Tabelle 4.3 aufgeführt.

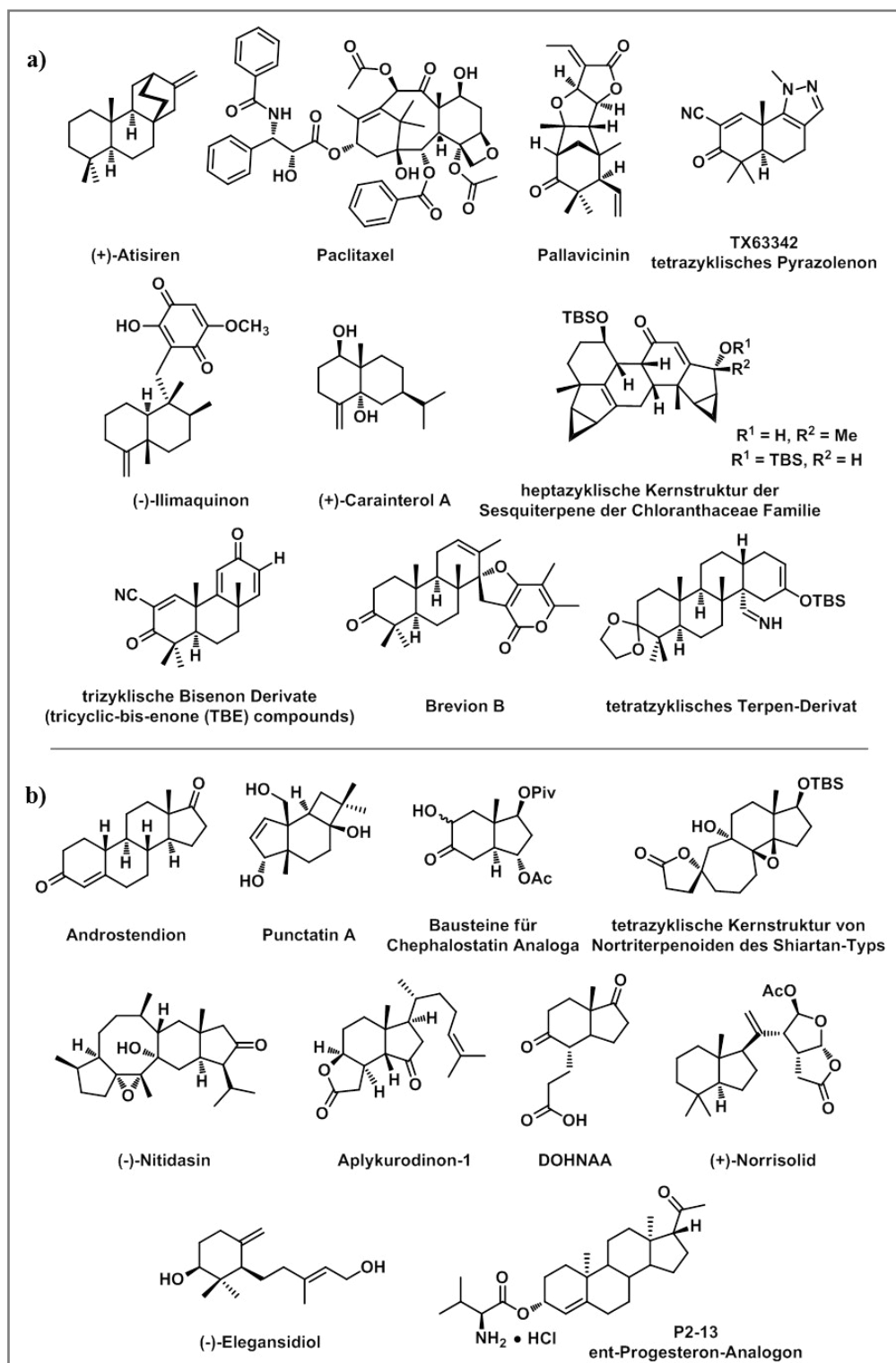


Abb. 4.6: Zielverbindungen ausgehend von den Enantiomeren des Wieland-Miescher-Ketons (a) und des Hajos-Parrish-Ketons (b) (vergl. Tab. 4.3).

4 Diskussion

Tab. 4.3: Beispiele für die chemisch synthetische Herstellung von Natur- und Wirkstoffen sowie ihrer Derivate oder Kernstrukturen ausgehend von den beiden Enantiomeren des Wieland-Miescher- und des Hajos-Parrish-Ketons über die Zwischenstufen (4*S*,5*S*)- und (4*R*,5*R*)-2 sowie (4*S*,5*S*)- und (4*R*,5*R*)-1. (m) = Verbindung in α -Position zu α,β -ungesättigten Carbonylgruppe methyliert.

Zwischenprodukt	Zielverbindung	Bioaktivität	Literatur
Wieland-Miescher-Keton			
(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2	(+)-Atisiren	-	Ihara et al., 1986
(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2	Paclitaxel	antitumor	Danishefsky et al., 1996
(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2	(\pm)-Pallavicinin, (\pm)-Neopallavicinin	-	Peng et al., 2006
(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2/(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2 (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2 (m)	trizyklische Pyrazol- und Pyrimidinenone	entzündungshemmend	US 8513436 B2
(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2 (m)	(-)-Ilimaquinon	antimikrobiell, anti-HIV, entzündungshemmend, sekretionshemmend	Bruner et al., 1995
(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2	(+)-Carainterol A	anti- <i>Pyricularia oryzae</i> P-2b Aktivität	Ma et al., 2010a
(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2	heptazyklische Kern- struktur der Sesquiterpe- ne aus der Chloran- thaceae Familie	-	Lu et al., 2011
(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2 (m) (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2 (m)	trizyklische Bisenon- Derivate	entzündungshemmend, chemopräventiv	Honda et al., 2003
(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2 (m)	Brevion B	potenzielles Herbizid	Takikawa et al., 2006
(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2 (m)	Tetrazyklische Terpen- Derivate	Endothelin-1 Antagonist, Inhibitor von Ca ²⁺ -Kanälen	Lu et al., 2015
Hajos-Parrish-Keton			
(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-1	Androstendion	Hormonvorläufer	Micheli et al., 1974
(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-1	(-)-Punctatin A, (+)-Punctatin D	Antibiotika	Sugimura et al., 1987
(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-1	Chirale Bausteine für die Synthese von Chepha- lostatin Analoga	-	Yunus et al., 2005
(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-1	tetrazyklische Kernstruk- tur von Nortriterpenoiden des Shiartan-Typs	-	Mehta et al., 2013
(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-1	(-)-Nitidasin	isolierte Verbindung aus dem „Hercampuri“, (Tee aus der peruanischen Volksmedizin)	Hog et al., 2014
(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-1	Aplykurodinon-1	-	Tang et al., 2014

4 Diskussion

Fortsetzung Tab. 4.3

Zwischenprodukt	Zielverbindung	Bioaktivität	Literatur
(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-1	DOHNAA (9,17-Dioxo-1,2,3,4,10,19-hexanorandrostan-5-oic acid)	Katabolit im Cholesterin Stoffwechsel von <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Stubbing et al., 2015
(4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-1 (m)	(+)-Norrisolid	antifungal, antimikrobiell, antiviral, antitumor, Antifraßstoff	Brady et al., 2005
(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-1	(-)-Elegansidiol	-	Cao et al., 2007
(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-1	ent-Progesteron-Analoga	Neuroprotektion	US 20110306579 A1

Bei den Synthesen, ausgehend von WMK über die (4*S*,5*S*)- bzw. (4*R*,5*R*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketone als Zwischenstufe, handelt es sich meistens um die Herstellung von polyzyklischen Terpen-Strukturen. In den Zielverbindungen sind die bityklischen Einheiten der beiden eingesetzten Enantiomeren zu erkennen. Ausnahmen bilden Paclitaxel und Pallavicinin. Ähnliches gilt für die Verwendung der beiden Enantiomere von HPK. Mit Ausnahme von (-)-Elegansidiol ist in allen Zielverbindungen (Terpen- oder Steroidstrukturen) der ursprüngliche Bityklus zu erkennen. In den Steroidstrukturen (Androstendion und P2-13) ist erkennbar, dass der ursprüngliche Bityklus die Ringe C und D des Grundgerüsts bildet. Auffällig war, dass sich während der Synthese häufig die Alkoholfunktion der α,β -ungesättigten Hydroxyketone, welche durch die Reduktion mit NaBH₄ erhalten wurde, verliert. Bei genauerer Betrachtung der Syntheserouten war ersichtlich, dass die Reduktion zur Herstellung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone immer der erste Schritt ist (unter Vernachlässigung der Herstellung der Diketone über die Robinson-Anellierung: Wieland et al., 1950; Hajos et al., 1974; Eder et al., 1971). Dieser Aspekt unterstützt die potenzielle Verwendung von Enzymen für die Reduktion, da in den ersten Stufen einer Syntheseroute immer größere Mengen Ausgangsmaterial und somit auch viel NaBH₄ (mit den damit beschriebenen Nachteilen) eingesetzt werden muss, um die Verluste im Laufe der Synthese zu kompensieren und am Ende genug von der Zielverbindung zu erhalten. Einige der gezeigten Beispiele gingen zudem nicht direkt von WMK oder HPK aus, sondern von ihren in α -Position zur α,β -ungesättigten Carbonylgruppe methylierten Derivaten (Abb. 4.7). Diese Verbindungen wurden bisher nicht für At2g29350 oder CoTR getestet, stellen jedoch interessante Substrate für weitere Arbeiten dar.

4 Diskussion

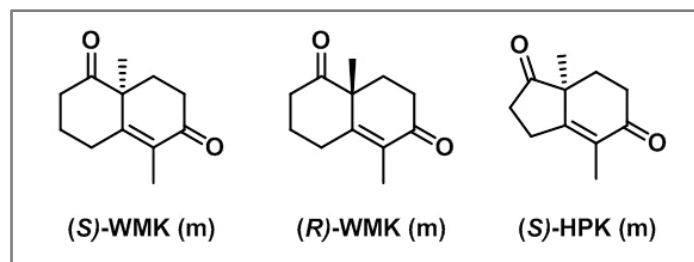


Abb. 4.7: In α -Position zur α,β -ungesättigten Carbonylgruppe methylierte Derivate des Wieland-Miescher- und des Hajos-Parrish-Ketons.

In der Literatur konnten keine biotechnologischen Arbeiten gefunden werden, in denen isolierte Enzyme für die Reduktion von WMK oder HPK eingesetzt werden, sondern ausschließlich Studien unter Verwendung ganzer Zellen. Primäres Ziel der meisten Arbeiten war zudem nicht die Herstellung möglicher Reduktionsprodukte ausgehend von den Diketonen, sondern die Trennung der racemischen Diketonverbindungen mittels kinetischer Racematspaltung, um die enantiomerenreinen Diketone zu erhalten (Tab. 4.4).

Tab. 4.4: Biokatalytische Ansätze zur Reduktion des Wieland-Miescher- und des Hajos-Parrish-Ketons.

Organismus	Ansatz	Literatur
<i>Curvularia falcate</i>	erste biokatalytische Reduktion der (\pm)-Diketone Produkte: (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2, (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-2 und (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-1, (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-1	Prelog et al., 1956, Acklin et al., 1958a
<i>Aspergillus niger</i>	biokatalytische asymmetrische Reduktion des (\pm)-WMK; Produkte: (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2, (4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2, (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2, (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-2	Acklin et al., 1958b
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kinetische Racematspaltung (\pm)-HPK \rightarrow (<i>R</i>)-HPK + (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-1 (\pm)-WMK \rightarrow (<i>R</i>)-WMK + (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2 + (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-2	Hioki et al., 2000
<i>Torulaspora delbrueckii</i> IFO 10921	Kinetische Racematspaltung (\pm)-WMK \rightarrow (<i>R</i>)-WMK + (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2 (\pm)-HPK \rightarrow (<i>R</i>)-HPK + (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-1	Fuhshuku et al., 2000, Fuhshuku et al., 2003
<i>Didymosphaeria igniaria</i> und <i>Coryneum betulinum</i>	Kinetische Racematspaltung (\pm)-WMK \rightarrow (<i>R</i>)-WMK + (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-2 + (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-2 (<i>R</i>)-WMK \rightarrow (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-2 (\pm)-HPK \rightarrow (<i>R</i>)-HPK + (4 <i>S</i> ,5 <i>S</i>)-1 + (4 <i>S</i> ,5 <i>R</i>)-1 (<i>R</i>)-HPK \rightarrow (4 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-1	Janeczko et al., 2010

In diesen Arbeiten waren die Reduktionsprodukte nur von untergeordnetem Interesse. Jedoch zeigte sich in einigen Arbeiten, dass ähnlich wie mit At2g29350 nur die (4*S*,5*S*)-Produkte ausgehend von dem racemischen Diketonen gebildet werden (Hioki et al., 2000; Fuhshuku et al., 2000; Fuhshuku et al., 2003). Die kinetische Racematspaltung wäre als zusätzliches Einsatzgebiet für At2g29350 und CoTR bzw. ihre Enzymvarianten denkbar. So setzten At2g29350

und At2g29350(S26A,A48D) bevorzugt das (*S*)-Enantiomer vom WMK um, während CoTR und CoTR(S27A,A49D) das (*R*)-Enantiomer vom HPK bevorzugten (vergl. Tab. 3.8, Abb. 3.26 und 3.28). Somit wurden (*R*)-WMK und (*S*)-HPK nur sehr untergeordnet reduziert. Würde es in Optimierungsexperimenten gelingen, diese Präferenz der Enzyme zu einer Substratspezifität weiter zu entwickeln, könnten die resultierenden Enzymvarianten für die kinetische Racematspaltung eingesetzt werden.

4.4 Kristallstruktur von CoTR im Vergleich zu den Homologiemodellen und den Kristallstrukturen der Tropinonreduktasen I und II

Für die Untersuchung der Substratbindung und Produktbildung sollten Kristallstrukturen der beiden Wildtyp-Enzyme At2g29350 und CoTR ermittelt werden. At2g29350 konnte jedoch in verschiedenen Ansätzen nicht kristallisiert werden. Für CoTR wurden hingegen zwei Kristallstrukturen im Komplex mit NADP⁺ sowie Acetat (Struktur A) bzw. einem unbekanntem Liganden (Struktur B) erhalten. Beiden Kristallstrukturen liegt eine asymmetrische Einheit von vier Ketten (A-D) zu Grunde. Durch die symmetrieverwandten Moleküle zeigte sich, dass CoTR wie im löslichen Zustand als Tetramer vorliegt (Abschnitte 3.1.4.5 und 3.4.2).

Die Kristallstrukturen von CoTR ermöglichen den direkten Vergleich mit den vorhandenen Homologiemodellen. Das erste veröffentlichte Homologiemodell von CoTR diente zur Diskussion der Bindung von Tropinon in der Substratbindetasche (Brock et al., 2008). In dem Modell wurde die Substratbindetasche durch 11 Aminosäuren (**C107**, T109, **V156**, **V162**, G165, **F200**, **L205**, **A206**, **Y209**, **V219**, I222) gebildet. Die Kristallstruktur offenbarte, dass die Substratbindetasche von 12 Aminosäuren gebildet wird (**C107**, **V156**, A157, **V162**, V164, **F200**, **L205**, **A206**, **Y209**, F210, F215, **V219**; vergl. Abb. 3.40). Damit war hinsichtlich der Substratbindetasche die Übereinstimmung zwischen Homologiemodell und Kristallstruktur bei nur acht Aminosäuren (fett gedruckt) gegeben. Zudem sind die Aminosäuren A157, V164, F210 und F215 im Homologiemodell nicht an der Ausbildung der Substratbindetasche beteiligt. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll, die Bindung von Tropinon durch CoTR anhand der erhaltenen Kristallstruktur mit Dockingansätzen zu überprüfen. Das Strukturalignment der Kette A aus der Kristallstruktur B von CoTR mit dem optimierten Homologiemodell (Fischer, 2015) zeigte, dass sich die Kernstruktur in Form der Rossmann-Faltung einschließlich der N-terminalen Cosubstratbinderegion auf Ebene des Rückgrats zwischen den beiden Modellen kaum unterscheidet (Abb. 4.8b) Dieser Aspekt spricht für die Verwendung der Homologiemodelle für die Optimierung der Cosubstratpräferenz, solange die Kristallstrukturen von CoTR noch nicht vorlagen.

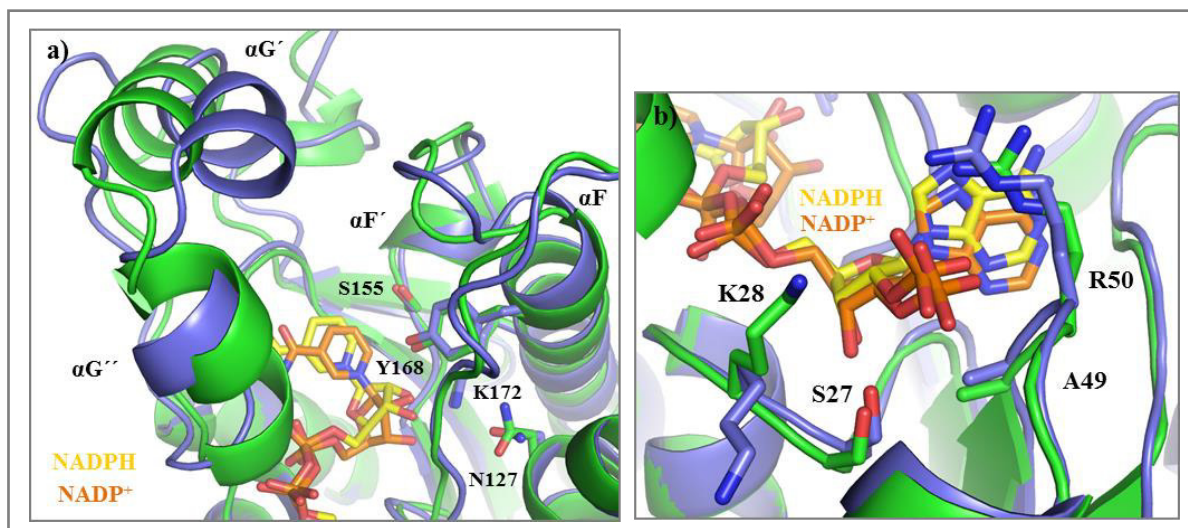


Abb. 4.8: Vergleich der Kristallstruktur von CoTR mit dem Homologiemodell. Kristallstruktur: grün, mit NADP⁺ (orange); Struktur B, Kette A. Homologiemodell: blau, mit NADPH (gelb); Fischer, 2015. a) Substratbindetasche mit katalytischer Tetrade (Sticks ohne Hauptkette), b) N-terminale Cosubstratbinderegion mit relevanten Aminosäuren (Sticks ohne Hauptkette).

Wurden hingegen die Bereiche der Helices $\alpha G'$, $\alpha G''$ sowie der Loop-Bereich zwischen $\alpha F'$ und αF verglichen, so sind deutliche Unterschiede im Rückgrat der beiden Strukturen detektierbar (Abb. 4.8a). Da die zwei Helices und die Loop-Struktur jedoch maßgeblich an der Ausbildung der Substratbindetasche beteiligt sind, zeigt der Vergleich die erwartete Limitierung des Homologiemodells bezüglich der Vorhersage von Substratbindung und Produktbildung (vergl. Abschnitt 1.5).

Zusätzlich zu den Homologiemodellen wurden die Kristallstrukturen von CoTR mit den Kristallstrukturen der Tropinonreduktasen I und II aus *D. stramonium* verglichen (Tab. 4.5).

Tab. 4.5: Übersicht der Kristallstrukturen der Tropinonreduktasen I und II aus *D. stramonium*. (*) Ketten stehen über Dimerisierungsachse (Q-Achse) in Kontakt.

PDB-Code	Enzym und Liganden	Auflösung	Raumgruppe	Asymmetrische Einheit	Literatur
1AE1	TRI + NADP ⁺	2,4 Å	P2 ₁ 2 ₁ 2	Kette A und B*	Nakajima et al., 1998
2AE1	TRII	2,3 Å	P4 ₂ 2 ₁ 2	Kette A	Nakajima et al., 1998
2AE2	TRII + NADP ⁺ + Pseudotropin	1,9 Å	P6 ₂ 22	Kette A und B*	Yamashita et al., 1999
1IPE	TRII + NADPH	2,5 Å	P6 ₂ 22	Kette A und B*	Yamashita et al., 2003
1IPF	TRII + NADPH + Tropinon	2,5 Å	P6 ₂ 22	Kette A und B*	Yamashita et al., 2003

4 Diskussion

Die Kristallstruktur von TRI weist wie die Kristallstruktur A von CoTR eine orthorhombische Raumgruppe auf. Den Strukturen von TRII liegen hingegen eine tetragonale (P4₁2₁2) oder hexagonale Raumgruppe (P6₂22) zu Grunde. Im Gegensatz zu den Kristallstrukturen A und B bestehen die asymmetrischen Einheiten von TRI und TRII (Ausnahme: Apoenzym von TRII (2AE1)) aus nur zwei Ketten. Die Ketten A und B bilden über die Q-Achse das für SDR typische Dimer, entsprechend den Ketten C und D in den beiden CoTR-Kristallstrukturen (Abb. 3.35). Die Größen der Interaktionsflächen für die Bildung der Dimere betragen 1380,7 Å² bei TRI und zwischen 1277,2-1280,8 Å² für TRII und sind somit von vergleichbarer Größe zu den Flächen in den Kristallstrukturen A und B von CoTR (Tab. 4.6).

Tab. 4.6: Interaktionsflächen zur Ausbildung der Quartärstruktur in den Kristallstrukturen der Tropinonreduktasen I und II im Vergleich zu der durchschnittlichen Größe in den Kristallstrukturen A und B von CoTR. Analysiert mit PDBePISA/ EMBL-EBI. (sym) = Kette aus benachbarter asymmetrischer Einheit.

PDB-Code	Kette und Flächengröße [Å ²]					
	Dimer		Tetramer, große Fläche		Tetramer, kleine Fläche	
1AE1	A/B	1380,7	A/A(sym)	1653,8	A/B (sym)	479,6
			B/B (sym)	1660,0		
2AE1	A/A(sym)	1280,8	A/A(sym)	1759,6	A/A(sym)	740,0
2AE2	A/B	1283,4	A/B(sym)	1756,2	A/A(sym)	733,1
			B/B(sym)		711,1	
1IPE	A/B	1285,5	A/B(sym)	1768,8	A/A(sym)	692,2
			B/B(sym)		701,6	
1IPF	A/B	1277,2	A/B(sym)	1765,9	A/A(sym)	703,2
			B/B(sym)		710,2	
CoTR/Struktur A	∅	1377,9	∅	1586,6	∅	785,3
CoTR/Struktur B	∅	1379,1	∅	1575,2	∅	774,0

In der Literatur werden die Tropinonreduktasen aus *D. stramonium* auf Basis von Gelfiltrationsmessungen im löslichen Zustand und in Verbindung mit den Kristallstrukturen im Gegensatz zu CoTR (Tetramer) als Dimere beschrieben (Tab. 4.5 und 4.7). Werden die asymmetrischen Einheiten in den Kristallstrukturen jedoch um ihre symmetrieverwandten Moleküle ergänzt, so ergibt sich eine Struktur entsprechend der Tetramere in den Kristallstrukturen von CoTR. In Abbildung 4.9 sind die potenziellen Tetramere von TRI (1AE1) und TRII (1IPF) auf dem Tetramer von CoTR (Kristallstruktur A und B, Ketten C und D) abgebildet.

4 Diskussion

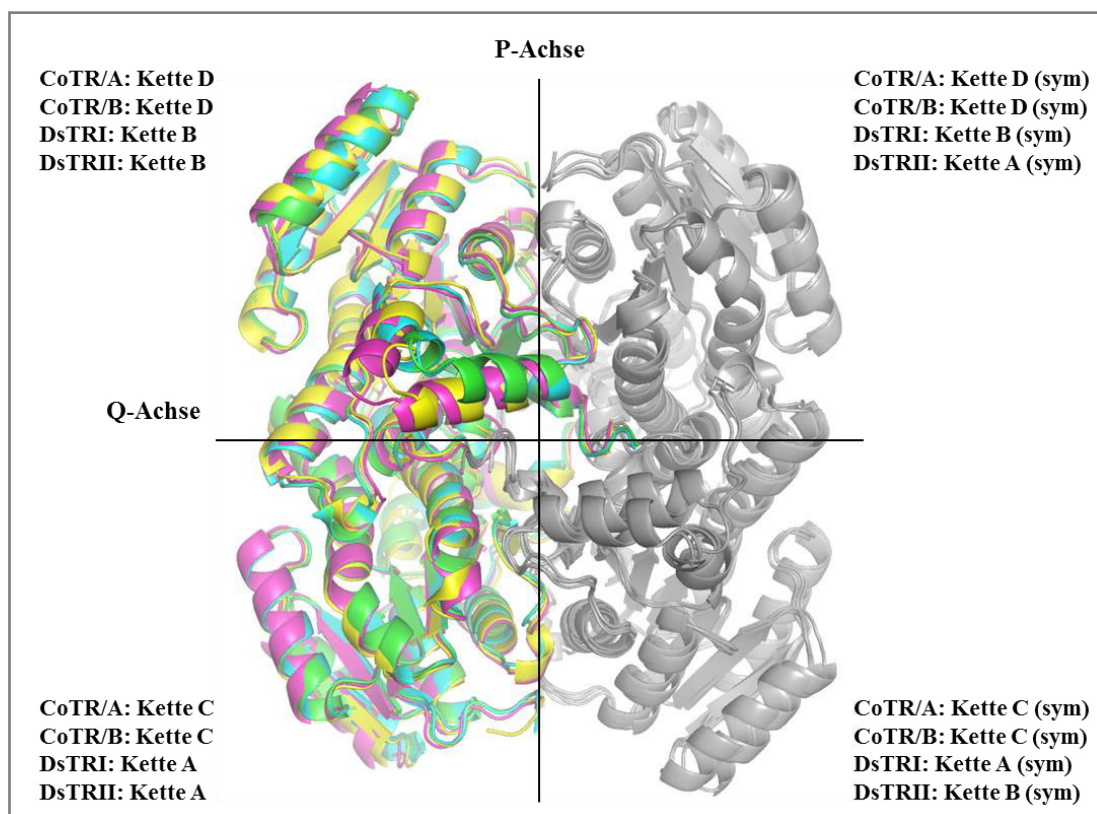


Abb. 4.9: Potenzielle Tetramere in den Strukturen von DsTRI und DsTRII im Vergleich zu den Tetrameren in den Kristallstrukturen von CoTR (Kette C und D). Hellblau: Kristallstruktur A von CoTR; grün: Kristallstruktur B von CoTR; pink: DsTRI (1AE1); gelb: DsTRII (1IPF); grau: symmetrieverwandte asymmetrische Einheiten.

Zusätzlich sind in Tabelle 4.6 die Interaktionsflächen zwischen den Monomeren entlang der P-Achse zur Ausbildung der Tetramere angegeben. Die Flächen haben eine Größe von 1653,8-1660,0 Å² für TRI und von 1756,2-1768,8 Å² für TRII und sind somit sogar etwas größer als in den CoTR-Kristallstrukturen. Für einen weiteren Vergleich wurden andere SDR-Kristallstrukturen betrachtet, die eindeutig als Tetramere beschrieben sind. Die Struktur der Alkohol Dehydrogenase aus *Ralstonia sp.* (DSMZ 6428, PDB-Code: 4I5D; Lerchner et al., 2013) weist eine asymmetrische Einheit mit acht Ketten auf. Die Ketten A-C und H sowie D und E-G bilden in der asymmetrischen Einheit zwei Tetramere. Die Flächen haben eine Größe von 1549,8-1569,1 Å² (Dimere) und 1467,4-1482,1 Å² (Tetramere). Der Kristallstruktur der 3β/17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase (PDB-Code: 1HXH; Benach et al., 2002) liegt eine asymmetrische Einheit aus vier Ketten zu Grunde. Kette A und C sowie B und D bilden die Dimere (Fläche: 1695,1-1697,6 Å²) und zusammen bilden die vier Ketten das Tetramer innerhalb der asymmetrischen Einheit (Fläche: 1603,8-1680,3 Å²). Die asymmetrische Einheit und die Ausbildung des Tetramers der 3α/20β-Hydroxysteroid Dehydrogenase (PDB-Code: 2HSD; Ghosh et al., 1994) entspricht der 3β/17β-Hydroxysteroid Dehydrogenase. Die Flä-

4 Diskussion

chen haben eine Größe von 1621,9-1674,7 Å² (Dimer) und 1607,0-1689,8 Å² (Tetramer). Folglich weisen die Strukturen Interaktionsflächen in vergleichbarer Größe wie CoTR und die TR auf. Dieses Ergebnis bestätigt die Ausbildung der Tetramere in den Kristallstrukturen von CoTR, wirft jedoch mit Blick auf das Dimer-Tetramer-Gleichgewicht von At2g29350 die Frage auf, ob sich die Tropinonreduktasen ähnlich verhalten. Diese Vermutung wird durch eine kritische Betrachtung der Ergebnisse aus den Gelfiltrationsmessungen für die DsTRI und DsTRII unterstützt (Tab. 4.7). So liegen die Werte für das native Molekulargewicht von DsTRI und DsTRII teilweise höher als es eigentlich für ein Dimer der Fall wäre.

Tab. 4.7: Natives Molekulargewicht verschiedener Tropinonreduktasen I und II. Molekulargewicht wurde über Gelfiltration bestimmt, Proteine wurden aus biologischer Matrix isoliert und gereinigt, (*) Ausnahme: Proteine wurden rekombinant aus *E. coli* erhalten. Ds, *Datura stramonium*; Hn, *Hyoscyamus niger*; Ps, *Pseudomonas ssp.*; Ab, *Atropa belladonna*. Faktor: $M_{\text{Gelfiltration}}/M_{\text{Monomer}}$; Homomer entsprechend Faktor: Di. = Dimer; Tri. = Trimer; Tet. = Tetramer.

Enzym	M_{Monomer} [kDa]	$M_{\text{Gelfiltration}}$ [kDa]	Faktor	Homomer	Literatur
DsTRI	29,6	56,0	1,9	Di.	Portsteffen et al., 1994
		50,7	1,7	Di.	Koelen and Gross, 1982
		79,0*	2,7*	Di./Tri.	Nakajima et al., 1994
DsTRII	27,7	77,7	2,8	Di./Tri.	Portsteffen et al., 1994
		82,0*	2,9*	Di./Tri.	Nakajima et al., 1994
HnTRI	30,0	115,0	3,8	Tet.	Hashimoto et al., 1992
HnTRII	29,0	103,0 (Hauptpeak)	3,6	Tet.	Hashimoto et al., 1992
		69,0 (Nebenpeak)	2,4	Di./Tri.	
		84,0	2,9	Di./Tri.	Dräger et al., 1988
PsTRI	28,0	58,0	2,1	Di.	Bartholomew et al., 1995
AbTRII	27,5	78,5	2,9	Di./Tri.	Dräger and Schaal, 1994

In Tabelle 4.7 sind zusätzlich die ermittelten Molekulargewichte für weitere Tropinonreduktasen wiedergegeben. TRI aus *Hyoscyamus niger* wies die Größe eines Tetramers auf, wohingegen die Werte für HnTRII nicht eindeutig für ein Dimer oder Tetramer sprechen. Ein ähnliches Ergebnis wurde für TRII aus *Atropa belladonna* erhalten, die das native Molekulargewicht zwischen einem Dimer und Tetramer zeigte. TRI aus *Pseudomonas ssp.* wies hingegen die Größe eines Dimers auf. Auf Basis dieser Ergebnisse wäre es folglich interessant, die Tropinonreduktasen auf mögliche Dimer-Tetramer-Gleichgewichte zu untersuchen. Dafür wären ähnliche Messungen wie für At2g29350 denkbar. Über analytische Ultrazentrifugation könnte ein Einfluss der Enzymkonzentration ermittelt und über Gelfiltration der Einfluss von Cosubstrat und Substrat untersucht werden. Zudem ermöglicht die Gelfiltration die Ermittlung der aktiven Spezies.

4 Diskussion

Abbildung 4.10a zeigt die Tertiärstruktur von CoTR im Vergleich mit den beiden Tropinonreduktasen aus *D. stramonium*.

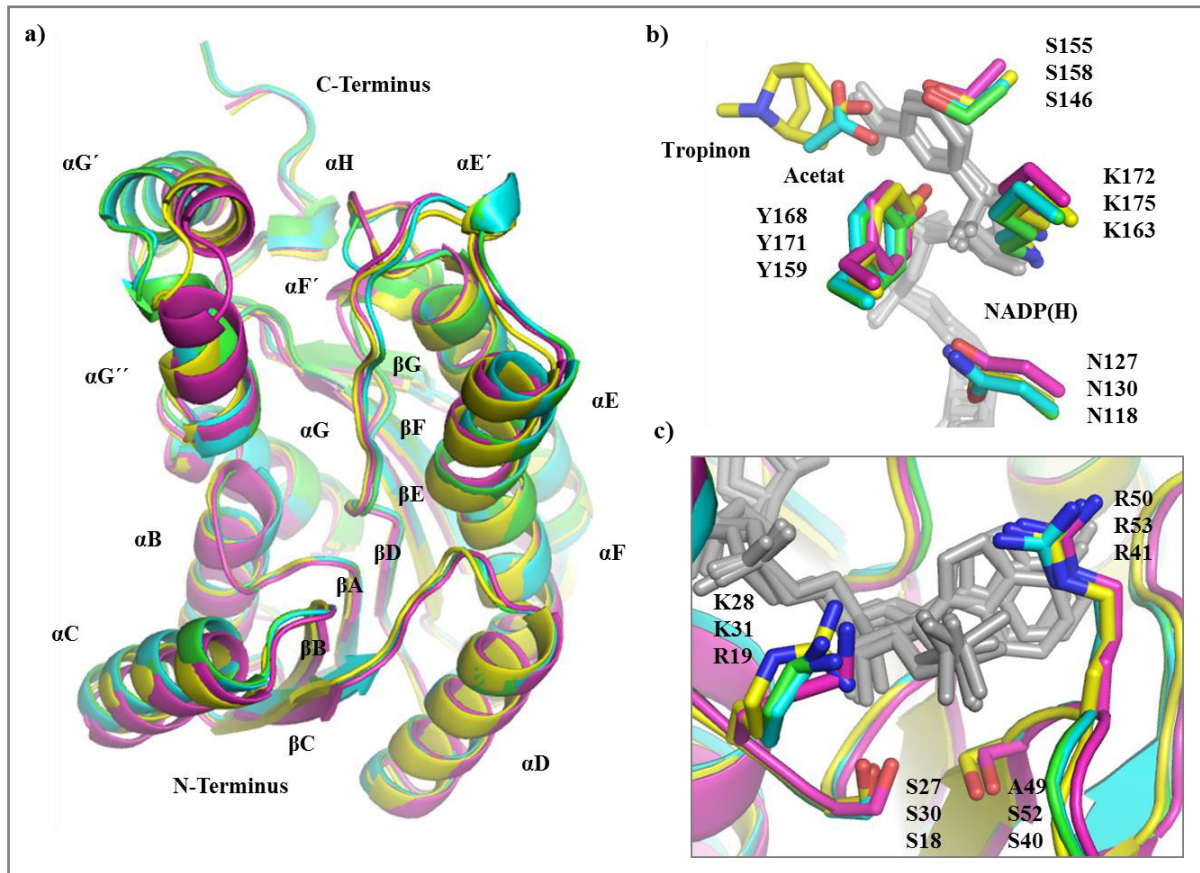


Abb. 4.10: Vergleich der Tertiärstruktur (a), der katalytischen Tetrade (b, mit Substrat) und des relevanten Cosubstratbindebereichs (c) in den Kristallstrukturen von CoTR, DsTRI und DsTRII. Blau: CoTR (Kristallstruktur A, Kette D); grün: CoTR (Kristallstruktur B, Kette D); pink: DsTRI (1AE1, Kette B); gelb: DsTRII (1IPF, Kette B). Beschriftung der Aminosäuren von oben nach unten: CoTR, TRI, TRII, vergl. Alignment Abb. 4.12. Aminosäuren zur Übersichtlichkeit ohne Hauptketten dargestellt. Grau: NADP(H).

Die Proteine weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit im Bereich der Rossmann-Faltung (Ausnahme: αC und βC) einschließlich des Cosubstratbindebereichs und der katalytischen Tetrade auf (Abb. 4.10a-c). Wird jedoch der Bereich der Substratbindetasche betrachtet, so sind deutliche Unterschiede (Abb. 4.10a; αG' und αG'' sowie Loop zwischen αF' und αF) erkennbar. So ist αG' im Vergleich zu den TR in CoTR deutlich nach außen verschoben. In Abbildung 4.11a ist die Struktur von CoTR mit dem kokristallisierten NADP⁺ und dem gedockten (*R*)-WMK zusammen mit der Struktur von TRII und den kokristallisierten Tropinon und NADPH gezeigt. Sowohl die Cosubstrate, als auch die Substrate liegen ähnlich positioniert in den beiden Strukturen vor. Beim Vergleich der molekularen Oberflächen der Substratbindetaschen zeigen diese eine vergleichbare Größe (Abb. 4.11). In DsTRII (Abb. 4.11c)

4 Diskussion

und DsTRI (nicht gezeigt) sind die Oberflächen jedoch nicht vollständig abgeschlossen, wie in der Struktur von CoTR (Abb. 4.11b).

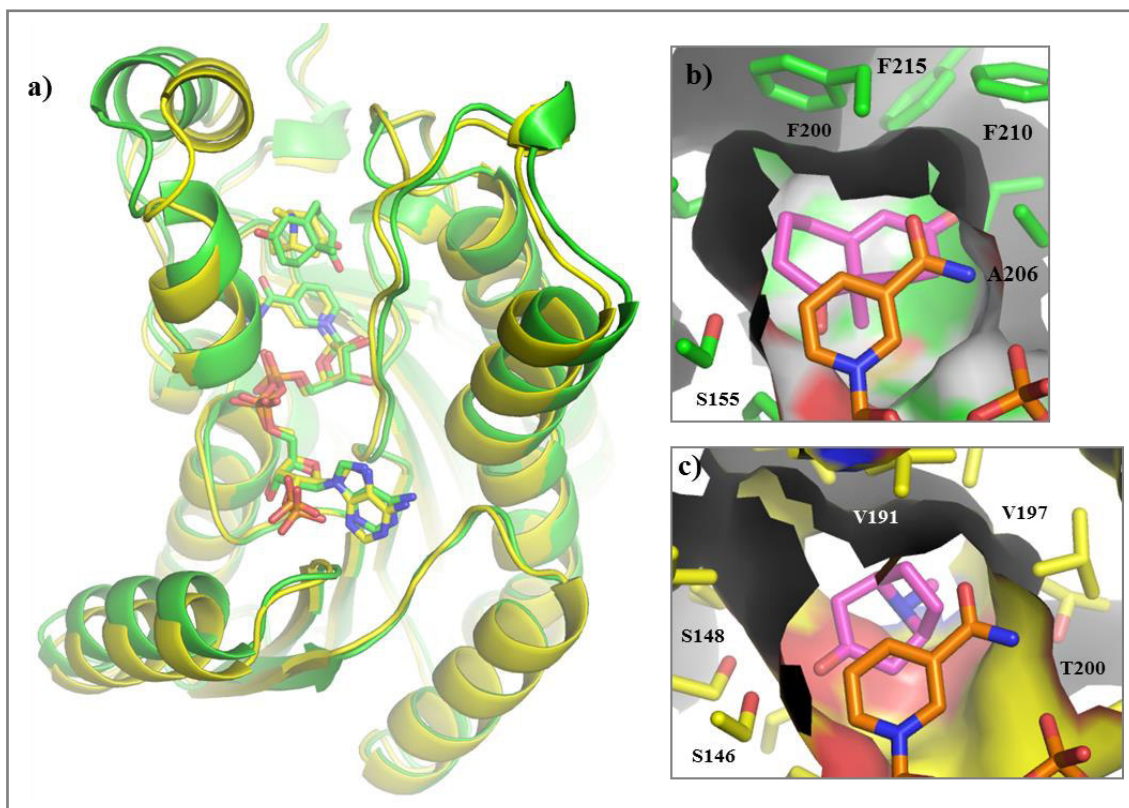


Abb. 4.11: Strukturalignment von CoTR und DsTRII mit Cosubstrat und Substrat sowie die molekulare Oberfläche der Substratbindetaschen. a) Grün: CoTR, Struktur B, Kette A, NADP⁺ und (*R*)-WMK (MOE-Ergebnis); gelb: DsTRII, 1IPF, Kette B, NADPH und Tropinon. b) Oberfläche von CoTR (Struktur B, Kette A), NADP⁺ (orange) und (*R*)-WMK (MOE-Ergebnis; pink). c) Oberfläche von TRII (1IPF, Kette B), NADPH (orange) und Tropinon (pink). Aminosäuren zur Übersichtlichkeit ohne Hauptketten dargestellt.

Die Substratbindetaschen von DsTRI und DsTRII werden wie bei CoTR durch überwiegend hydrophobe Aminosäuren gebildet (Abb. 4.12).

CoTR	SLREWQAKGFQVTTSCVDVSSRDQREKLMETVSSLFQGKLNILVNNAGTCITKPTIDYTS	117
DsTRI	CLEIWRKGLNVEGSVCDLLSRTERDKLMQTVAHVFDGKLNILVNNAGVVIHKAEKDFTE	120
DsTRII	CLTQWRSGFKVEASVCDLSSRSERQELMNTVANHFHGKLNILVNNAGIVVIYKEAKDYTV	108
	. * * : * : * : * * * * : * * : * : * : * : * : * : * : * : * * : * * : * : *	
CoTR	EDFSFLMSTNLESSFHLSQLAHPLLKSSGLGSIVLISSVASVHVNVGSIYGATKGAMNQ	177
DsTRI	KDYNIIMGTFEAAAYHLSQIAYPLLKASQNGNVI FLSSIAGFSALPSVSLYSASKGAINQ	180
DsTRII	EDYSLIMSINFEAAAYHLSVLAHPFLKASERGNVVFISVS GALAVPYEAVYGATKGAMDQ	168
	: * : : : * . * : * : : * * * * : * : * : * * * * * : * : * : * : * : * * : * :	
CoTR	LARNLACEWASDSIKVNSVCPGEISTPLASNYERNE-EFKKEVEN---IIPTGRVGEANE	233
DsTRI	MTKSLACEWAKDNIRVNSVAPGVILTPLVETAIKKNPHQKEEDNFIVKTPMGRAGKPOE	240
DsTRII	LTRCLAFEWAKDNIRVNGVGPVIATSLVEMTIQ-DPEQKENLNKLIDRCALRRMGEPKE	227
	: : * * * * . * : * : * : * * * * . * * . : : . * : : : : * * : * :	

Abb. 4.12: Sequenzalignment von CoTR, DsTRI und DsTRII. Blau: katalytische Tetrade; grün: Aminosäuren, die an der Ausbildung der Substratbindetaschen beteiligt sind; gelb: Aminosäuren für die ionischen Wechselwirkungen in TRI und TRII, entscheidend für die Orientierung von Tropinon.

4 Diskussion

Für die Substratpräferenz und die Produktbildung mit den Diketonen ist in CoTR einzig die hydrophobe Form der Bindetasche verantwortlich (Abb. 4.13a; vergl. Abschnitt 3.5 und 4.5). In DsTRI und DsTRII spielen zusätzlich zu den hydrophoben Wechselwirkungen geladene Aminosäuren in der Substratbindetasche eine Rolle für die Orientierung des Tropinons (Abb. 4.12 und 4.13). So stabilisiert in DsTRII ein negativ geladenes Glutamat (E156) über ionische Wechselwirkungen zum protonierten Stickstoffatom im Tropinon die Lage des Substrats in der Bindetasche (Abb. 4.13b und e). Ein positiv geladenes Histidin (H112) in der Bindetasche von DsTRI sorgt hingegen dafür, dass das Tropinon nicht wie in DsTRII positioniert sein kann, da es sonst zu ionischer Abstoßung zwischen dem Histidin und dem protonierten Stickstoffatom im Tropinon kommt (Abb. 4.13c und f).

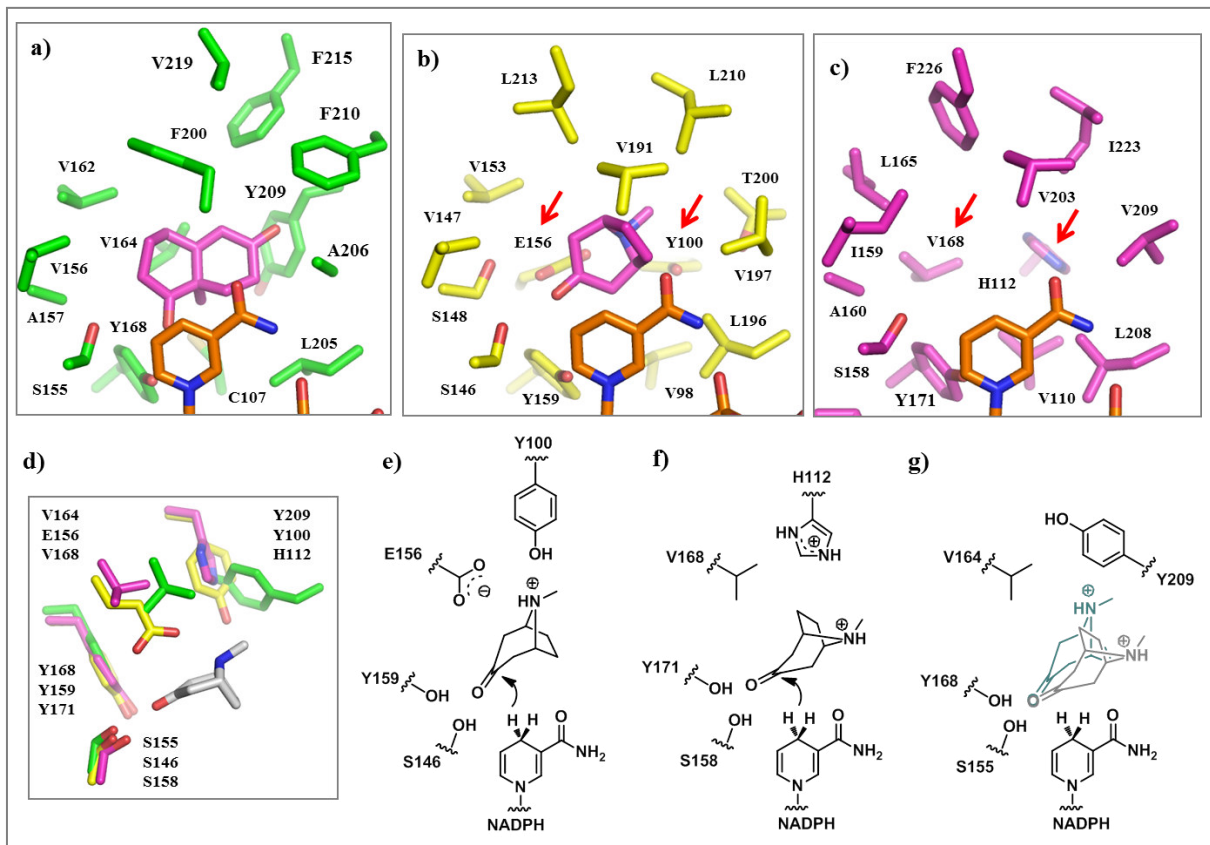


Abb. 4.13: Substratbindetaschen von CoTR, DsTRII und DsTRI. a) CoTR (grün; Struktur B, Kette A) mit NADPH (orange) und (*R*)-WMK (pink; MOE-Ergebnis); b) DsTRII (gelb; 1IPF, Kette B) mit NADPH (orange) und Tropinon (pink); c) DsTRI (pink; 1AE1, Kette B) mit NADP⁺ (orange). Rote Pfeile und d) relevante Aminosäuren für die ionischen Wechselwirkungen in TRI (pink) und TRII (gelb) im Vergleich mit CoTR (grün), zusätzlich S und Y der katalytischen Tetrade, Beschriftung der Aminosäuren von oben nach unten: CoTR, TRII, TRI. Grau: Tropinon aus 1IPF. Schematische Darstellung der ionischen Wechselwirkungen in TRII (e) und TRII (f) für die Orientierung von Tropinon (modifiziert nach Yamashita et al., 1999). Zum Vergleich: g) Schematische Darstellung von CoTR mit Tropinon in beiden Orientierungen.

Durch diese Abstoßung ergibt sich eine andere Orientierung für das Tropinon in DsTRI und das Hydrid wird auf die andere Seite der Carbonylgruppe übertragen als durch DsTRII (Ya-

4 Diskussion

mashita et al., 1999). So kommt es durch die verschiedenen Orientierungen in DsTRI zur Bildung von Tropin und in DsTRII von Pseudotropin (vergl. Abb. 1.8). In CoTR liegen in den analogen Positionen von E156 und H112 sowie in der gesamten Bindetasche keine Aminosäuren vor, die durch ionische Wechselwirkungen Tropin in der Substratbindetasche orientieren könnten (Abb. 4.13a, d und g). Diese Beobachtung stimmt damit überein, dass CoTR Tropin nur unspezifisch reduziert (Brock et al., 2008; Brock, 2008). Das Docken von Tropin in die Kristallstruktur von CoTR würde sich dennoch anbieten, um eine Vorstellung davon zu bekommen wie das Substrat im Enzym gebunden wird.

4.5 Mechanismus der Substratbindung und Produktbildung

Die Kristallstrukturen von CoTR zeigen eine vollständig abgeschlossene, überwiegend hydrophobe Substratbindetasche (Abschnitt 3.4.3.2). Zusammen mit dem kokristallisierten NADP^+ und dem Acetat bzw. unbekanntem Liganden in der Substratbindetasche (Abschnitt 3.4.3.2) wird davon ausgegangen, dass ein ternärer Komplex vorliegt. Um den Mechanismus der Substratbindung untersuchen zu können, wurden die Diketone in die Substratbindetasche gedockt. Unter der Annahme, dass die Form der Substratbindetasche in der Kristallstruktur der Form der Bindetasche mit gebundenen Diketonen entspricht, sollten Substrate für CoTR nicht viel größer sein als die Diketone (vergl. Abschnitt 3.5). Die theoretischen Ergebnisse der Dockingstudien, sowohl mit dem Programm MOE als auch mit dem Programm GOLD, stimmten im Wesentlichen mit den experimentell erhaltenen Ergebnissen zu Substratpräferenz und Produktbildung überein (Abschnitte 3.3.2, 3.3.3.4 und 3.3.4). Es zeigte sich, dass die Lokalisierung der Carbonylgruppe an C5 der Diketone im unteren Teil von Bereich 1 ihre Reduktion durch den Nikotinamidring und die katalytische Tetrade begünstigt. Diese Anordnung war nur für die (*R*)-Enantiomere gegeben (Abb. 3.44-3.45). Im Falle von (*S*)-WMK kann die Carbonylgruppe an C5 nicht am unteren Rand des Bereichs 1 positioniert werden, da die Methylgruppe dann nicht in den Bereich 3 orientiert wäre, sondern in Richtung des Nikotinamidrings. Eine derartige Anordnung würde zur sterischen Hinderungen zwischen der Methylgruppe und dem Nikotinamidring führen und somit den Hydridtransfer verhindern. Diese wesentlich schlechtere Passform von (*S*)-WMK in die Substratbindetasche von CoTR im Vergleich zu (*R*)-WMK passt zur experimentell belegten um das 4,6-Fache geringeren Affinität von (*S*)-WMK gegenüber (*R*)-WMK (Abschnitt 3.3.4). Für (*S*)-HPK konnte keine Docking-Pose erhalten werden. Es wird jedoch vermutet, dass dieses Substrat ähnlich wie (*S*)-WMK in der Substratbindetasche orientiert ist. Allerdings wäre dann die Carbonylgruppe an C5 durch den kleineren 5-Ring zu weit vom katalytischen Tyrosin entfernt, um eine stabile Wasserstoff-

4 Diskussion

brücke auszubilden. Diese Konstellation könnte erklären, weshalb für CoTR und ihre Enzymvarianten keine Aktivität (Abschnitt 3.3.2) mit (*S*)-HPK messbar war und mit diesem Diketon mittels GCMS nur eine äußerst geringe Produktbildung (Abschnitt 3.3.3.4) detektiert wurde. Für die zusätzliche Bildung der (*4R,5S*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketone wurde vermutet, dass diese durch eine leichte horizontale Drehung der (*R*)-Enantiomere der Diketone in der Substratbindetasche zustande kommen, weil so der nukleophile Angriff des Hydrids auf die *Re*- und nicht die *Si*-Seite der Carbonylgruppe erfolgen würde (Abschnitt 3.6). Diese Hypothese wird dadurch unterstützt, dass die Bildung des Nebenprodukts (*4R,5S*)-1 ausgehend vom HPK ausgeprägter war als ausgehend vom WMK (Tab. 4.8).

Tab. 4.8: Prozentuale Bildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone durch CoTR-Enzymvarianten. Die prozentualen Verhältnisse wurden aus der Semiquantifizierung der Produktbildung über die Peakflächen in der GCMS-Analyse ermittelt.

Enzym/Cosubstrat	(<i>R</i>)-Wieland-Miescher-Keton (<i>4R,5R</i>)-2:(<i>4R,5S</i>)-2	(<i>R</i>)-Hajos-Parrish-Keton (<i>4R,5R</i>)-1:(<i>4R,5S</i>)-1
CoTR/NADPH	98:2	76:24
CoTR(S27A,A49D)/NADH	98:2	76:24
CoTR(A206A)/NADPH	99:1	82:18
CoTR(S27A,A49D,A206S)/NADH	99:1	88:12

Dieses Ergebnis könnte daraus resultieren, dass (*R*)-HPK durch den kleineren 5-Ring leichter drehbar ist als (*R*)-WMK mit dem 6-Ring. Durch die Einführung eines Protonendonators in die Substratbindetasche (A206S; Abschnitt 3.6) wurde die Bildung der (*4R,5S*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketone ausgehend von beiden Diketonen verringert (Tab. 4.8), jedoch nicht vollständig unterbunden. Anhand der Dockingergebnisse (Abschnitt 3.5) konnten jedoch weitere Positionen ermittelt werden, die durch die Einführung eines Protonendonators einen ähnlichen Effekt auf die Bildung des Nebenprodukts haben könnten. Ausgehend vom MOE-Ergebnis mit (*R*)-HPK wird die Substitution F215Y vorgeschlagen (Abb. 4.14b). Die GOLD-Ergebnisse mit (*R*)-WMK sprechen hingegen für die Mutationen L205T oder L205S (Abb. 4.14a).

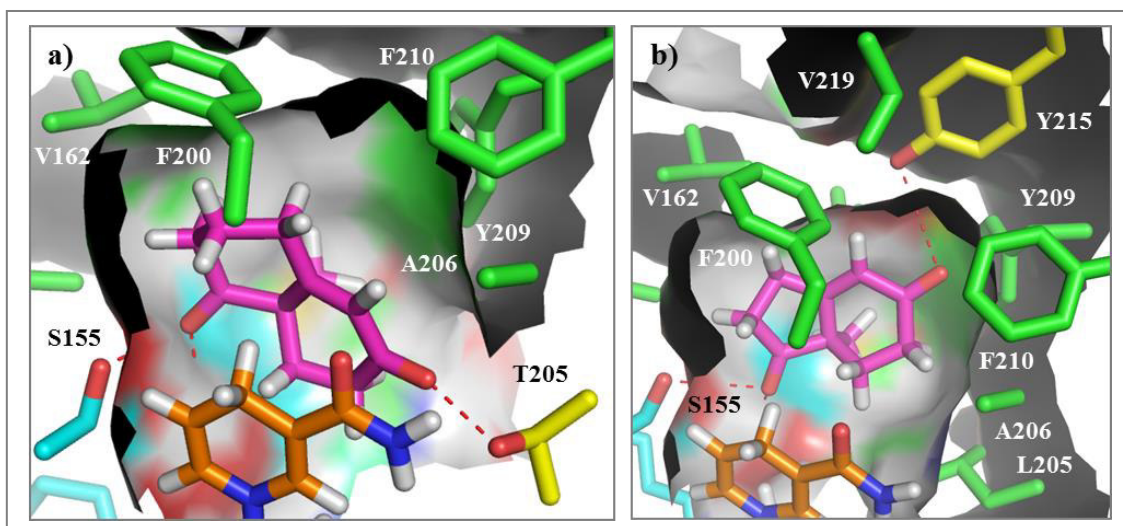


Abb. 4.14: Weitere potenzielle Mutationsstellen für die Einführung eines Protonendonators in CoTR zur Unterbindung der Bildung der $(4R,5S)$ - α,β -ungesättigten Hydroxyketone. a) Mutation L205T im Dockingergebnis (GOLD) von (R) -WMK.; b) Mutation F215Y im Dockingergebnis (MOE) von (R) -HPK. Oberflächen von T205, A206, F210 und F200 ausgeblendet. Aminosäuren zur Übersichtlichkeit ohne Hauptketten dargestellt.

An den GCMS-Ergebnissen und den kinetischen Messungen der Diketon-Umsetzung zeigte sich zudem, dass die Affinität des Cosubstrates die Affinität der Substrate sowie die Bildung von Nebenprodukten beeinflusst. So wies CoTR mit einer höheren Affinität zu NADPH auch eine höhere Affinität zu den (R) -Enantiomeren der Diketone im Vergleich zu CoTR(A49D) und CoTR(S27A,A49D) auf (Tab. 4.2 und 3.12). Dieser Effekt ließ sich auch in verschiedenen anderen Arbeiten beobachten (u. a. Nakanishi et al., 1997; Morikawa et al., 2005; Lerchner et al., 2013). Zudem zeigte sich anhand der Bildung der Nebenprodukte, dass durch CoTR mit NADPH und CoTR(S27A,A49D) mit NADH weniger bzw. geringere Mengen an Nebenprodukten gebildet werden als mit CoTR und CoTR(A49D) mit NADH (Tab. 3.10 und 3.11, Abb. 3.27 und 3.29). Dieses lässt sich durch den bi-bi-Mechanismus (Beispiele: Nakanishi et al., 1997; Sahni-Arya et al., 2007) und die Begrenzung der Substratbindetasche durch den Nikotinamidring erklären. Wird zuerst das Cosubstrat mit einer geringen Affinität gebunden, so könnte es dazu kommen, dass die Substratbindetasche nicht so stark durch den Nikotinamidring begrenzt wird. Dadurch könnte sich die Substratbindetasche vergrößern, und die Substrate könnten so leichter zusätzliche Orientierungen zur katalytischen Tetrade einnehmen, was die Bildung von Nebenprodukten begünstigt. Weiterhin würde dies dazu führen, dass die Stabilisierung der Position der Substrate durch die Struktur der Substratbindetasche abnimmt, wodurch folglich auch die Affinität zu den Substraten sinken würde.

4.6 Beurteilung der katalytischen Eigenschaften der Enzyme für ihre Anwendbarkeit als Biokatalysatoren

Die Messungen der Stabilität von NADH und NADPH in Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur (Abschnitt 3.1.4.3) offenbarte, dass die Cosubstrate am stabilsten bei einem neutralen pH-Wert von 7,5 und einer Temperatur von 20 °C waren und am wenigsten stabil bei einem sauren pH-Wert von 5,5 und einer Temperatur von 30 °C. Somit entsprechen die Assaybedingungen von At2g29350 (pH 5,5; 30 °C) sowie von CoTR und CoTR(S27A,A49D) (pH 5,0; 30 °C) an den pH-Optima der Enzyme nicht den optimalen Bedingungen in Bezug auf die Cosubstratstabilität. At2g29350(S26A,A48D) wies im Vergleich zum Wildtyp-Enzym eine Verschiebung des pH-Optimums zu pH 7,5 auf (Abschnitt 3.1.4.1) und besitzt somit die höchste Aktivität bei einem geeigneten pH-Wert in Bezug auf die Cosubstratstabilität. Alle vier Enzyme zeigten bei der Messung der Temperaturabhängigkeit der Enzymaktivität (Abschnitt 3.1.4.2), dass die spezifische Aktivität bei einer Temperatursenkung von 30 °C auf 20 °C nur um 11-23% sinkt, somit wäre eine Optimierung der Assaybedingungen bei niedriger Temperatur zum Erhalt der Cosubstratstabilität möglich, ohne einen zu hohen Aktivitätsverlust zu verursachen. Des Weiteren konnte die Proteinausbeute in *E. coli* (Abschnitt 3.1.3) für At2g29350 (27-57 mg/L Medium) und CoTR (52-66 mg/L Medium) gesteigert werden, und ihre NADH-bevorzugenden Enzymvarianten waren ebenfalls in hohen Ausbeuten zugänglich (At2g29350(S26A,A48D): 80-115 mg/L Medium; CoTR(S27A,A49D): 67 mg/L Medium). Dabei wurde mit der Aufreinigung nur über Metallionenaffinitätschromatographie eine hohe Reinheit (At2g29350 und At2g29350(S26A,A48D): $\geq 95\%$; CoTR und CoTR(S27A,A49D): 90-95%) erzielt. Zusätzlich waren die Enzyme über lange Zeiträume stabil (>1 Jahr), wenn sie bei -80 °C gelagert wurden. Da aus der Literatur keine kinetischen Daten für den Einsatz isolierter Enzyme zur Reduktion der Diketone bekannt sind, wurden die kinetischen Daten mit denen anderer anwendungsrelevanter Ketoreduktasen verglichen (Tab. 4.9).

Die Aminoalkoholdehydrogenase AADH aus *Rhodococcus erythropolis* MAK154 und ihre gegen Produktinhibierung optimierte Variante sind von Bedeutung für die stereospezifische Produktion von d-Pseudoephedrin (Urano et al., 2011). Die Enzyme zeigten anhand ihrer K_m -Werte für die Reduktion von (*R/S*)-1-Phenyl-1-keto-2-ethylaminopropan zu d-2-Ethyl-amino-1-phenyl-1-pro-panol eine ähnliche Substrataffinität wie CoTR mit (*R*)-WMK (AADH: $K_m = 295\text{-}406 \mu\text{M}$; CoTR: $K_m = 305,5 \mu\text{M}$). Zudem wurde mit AADH ein k_{cat} -Werte von $4,4 \text{ s}^{-1}$

4 Diskussion

erhalten, der in der Größenordnung von At2g29350 mit (*S*)-WMK und (*S*)-HPK lag ($k_{\text{cat}} = 3,09\text{-}3,18 \text{ s}^{-1}$).

Tab. 4.9: Kinetische Parameter von At2g29350- und CoTR-Enzymvarianten im Vergleich mit anwendungsrelevanten Ketoreduktasen. 1) Urano et al., 2011; 2) Morikawa et al., 2005; 3) Yin et al., 2014; 4) Schlieben et al., 2005. AADH, Aminoalkohol Dehydrogenase; S1, Carbonylreduktase; Gox2253, Oxidoreduktase; RADH, *R*-spezifische Alkoholdehydrogenase. (*R/S*)-EAM, (*R/S*)-1-Phenyl-1-keto-2-ethylamino-propan; COBE, Ethyl-4-chloro-3-oxobutanoat. (*) maximale spezifische Aktivität bei 0,8 mM NAD(P)H; (**) spezifische Aktivität bei 0,8 mM NADPH und 15 mM (*S*)-WMK.

Enzym/Cosubstrat	Substrat	V_{max} [nkat/mg]	K_m [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$]
At2g29350/NADPH	(<i>S</i>)-WMK	102,0 \pm 1,5	2374,0 \pm 99,7	3,09 \pm 0,05	0,0013 \pm 0,0005
At2g29350(S26A,A48D)/NADH	(<i>S</i>)-WMK	57,7 \pm 3,1*	-	-	-
At2g29350(V103A)/NADPH	(<i>S</i>)-WMK	120,7 \pm 5,0**	-	-	-
At2g29350/NADPH	(<i>S</i>)-HPK	105,0 \pm 1,8	2153,2 \pm 108,8	3,18 \pm 0,05	0,0015 \pm 0,0005
At2g29350(S26A,A48D)/NADH	(<i>S</i>)-HPK	54,0 \pm 1,9*	-	-	-
At2g29350(V103A)/NADPH	(<i>S</i>)-HPK	100,9 \pm 11,3*	-	-	-
CoTR/NADPH	(<i>R</i>)-WMK	14,9 \pm 0,3	305,5 \pm 24,6	0,46 \pm 0,01	0,0015 \pm 0,0003
CoTR(S27A,A49D)/NADH	(<i>R</i>)-WMK	31,3 \pm 0,3	1216,1 \pm 48,3	0,96 \pm 0,01	0,0008 \pm 0,0002
CoTR/NADPH	(<i>R</i>)-HPK	3,6 \pm 0,1	896,4 \pm 86,9	0,11 \pm 0,00	0,0001 \pm 0,00003
CoTR(S27A,A49D)/NADH	(<i>R</i>)-HPK	6,1 \pm 0,2	1766,6 \pm 154,1	0,19 \pm 0,01	0,0001 \pm 0,00003
AADH/NADPH ¹⁾	(<i>R/S</i>)-EAM	-	295	4,4	0,015
AADH(G73S,S214R)/NADPH ¹⁾	(<i>R/S</i>)-EAM	-	406	14,6	0,036
S1/NADPH ²⁾	COBE	463	3,0	-	-
S1(S41A,S42A,S43R,W63I,Y64D,N65I,S66N)/NADH ²⁾	COBE	165	2,6	-	-
Gox2253/NADPH ³⁾	Octanal	29	765,4 \pm 8,7	1,10 \pm 0,03	0,0014
Gox2253(R42Y)/NADH ³⁾	Octanal	25	811,5 \pm 3,9	0,95 \pm 0,03	0,0012
RADH/NADPH ⁴⁾	Acetophenon	-	2800 \pm 200	44,5 \pm 3,7	0,016
RADH(G37D)/NADH ⁴⁾	Acetophenon	-	10900 \pm 1100	35,7 \pm 3,6	0,003

4 Diskussion

Die Carbonylreduktase S1 aus *Candida magnoliae* und ihre Cosubstratoptimierte Enzymvariante reduzieren Ethyl-4-chloro-3-oxobutanoat (COBE) zu Ethyl-(S)-4-chloro-3-hydroxybutanoat. Dabei handelt es sich um den ersten Schritt in der Synthese von Atorvastatin (vergl. Abb. 1.1). Das Wildtyp-Enzym zeigte dabei mit NADPH eine maximale, spezifische Aktivität von 463 nkat/mg und die Enzymvariante mit NADH von 165 nkat/mg. Ähnliche V_{\max} -Werte wie die S1-Enzymvariante wurden von At2g29350 mit NADPH für die beiden (S)-Diketone erreicht, zudem wies At2g29350(V103A) spezifische Aktivitäten von 100,9-120,7 nkat/mg bei einer NADPH-Konzentration von 0,8 μM auf. Die Oxidoreduktase Gox2253, aus dem industriell genutzten Bakterium *Gluconobacter oxydans*, und ihre Cosubstratoptimierte Enzymvariante zeigten bei der Reduktion von Octanal eine ähnliche Affinität wie CoTR zu (R)-HPK und k_{cat} -Werte ähnlich zu CoTR(S27A,A49D) mit (R)-WMK. Allerdings wiesen Gox2253 und ihre Enzymvariante im Vergleich zu den anderen Studien, ähnlich wie CoTR und CoTR(S27A,A49D), relativ geringe V_{\max} -Werte auf (25-29 nkat/mg). Die R-spezifische Alkoholdehydrogenase RADH aus *Lactobacillus brevis* und ihre Cosubstratoptimierte Enzymvariante sind in der Lage Acetophenon stereospezifisch in den entsprechenden (R)-Alkohol zu reduzieren (Schlieben et. al, 2005). Dabei zeigte das Wildtyp-Enzym eine Affinität zu Acetophenon, die der von At2g29350 mit den (S)-Diketonen vergleichbar ist. Die k_{cat} -Werte sind hingegen im Vergleich zu den anderen Enzymen und Enzymvarianten sehr hoch (35,7-44,5 s^{-1}). Allgemein zeigte At2g29350 im Vergleich mit den anderen Enzymen gute und bessere katalytische Eigenschaften als CoTR und CoTR(S27A,A49D), die zwar höhere Affinitäten zu den (R)-Enantiomeren aufwiesen als At2g29350 zu den (S)-Enantiomeren, jedoch wesentlich geringere k_{cat} -Werte.

5 Zusammenfassung

Die beiden Enzyme At2g29350 und CoTR wurden als rekombinante, katalytisch aktive Proteine mit hoher Ausbeute in *E. coli* produziert und zeigten in der Lagerung bei -80 °C hohe Stabilität.

Durch Verwendung von Homologiemodellen war es möglich, die Cosubstratpräferenz der Enzyme von NADPH zu NADH gezielt zu ändern. Dazu waren insgesamt zwei Mutationen nötig: die Einführung einer sauren Aminosäure am Ende des zweiten β -Faltblattes sowie die Substitution des Serins im Glycin-reichen Motiv durch ein kleines Alanin. Während die Einführung der sauren Aminosäure bereits beschrieben wurde, zeigte die vorliegende Arbeit zum ersten Mal die Bedeutung der Serinmutation für die Änderung der Cosubstratpräferenz. Sequenzvergleiche mit NADH-bevorzugenden klassischen SDR und Studien zur Änderung der Cosubstratpräferenz von NADPH zu NADH unterstützen die Bedeutung der kleinen Aminosäure im Glycin-reichen Motiv. Für das Enzym At2g29350 und dessen Varianten wurde ein Enzym- und Cosubstratkonzentrationsabhängiges Dimer-Tetramer-Gleichgewicht gefunden. Für das Wildtypenzym At2g29350 hat dieses Gleichgewicht keine Bedeutung für die katalytische Aktivität. Für die Enzymvariante At2g29350(S26A,A48D) wird hingegen bei geringen Cosubstratkonzentrationen nur eine geringe Umsatzgeschwindigkeit erzielt. Die Erzeugung von chimären Enzymen sowie die Aufklärung der Kristallstruktur von CoTR bieten neue Ansatzpunkte für die Optimierung von At2g29350(S26A,A48D).

Sowohl für At2g29350 als auch für CoTR wurden neue anwendungsrelevante Substrate aus der chemischen Synthese gefunden. Die (*S*)-Enantiomere des Wieland-Miescher- und Hajos-Parrish-Ketons sind die bevorzugten Substrate für At2g29350 und die (*R*)-Enantiomere für CoTR. At2g29350 stellt aus den (*S*)-Enantiomeren stereospezifisch die (*4S,5S*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketone her und CoTR stereoselektiv die (*4R,5R*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketone. Die (*4S,5S*)- bzw. (*4R,5R*)- α,β -ungesättigten Hydroxyketone sind Produkte mit großem synthetischen Interesse, da sie auch durch die chemische Reduktion mit NaBH₄ erzeugt werden und somit ein Austausch des chemischen Reduktionsmittels durch die Enzyme denkbar ist. Beide Enzyme und ihre Enzymvarianten bieten durch ihre allgemeinen Enzymeigenschaften (Abhängigkeit von pH-Wert und Temperatur) in Verbindung mit der Cosubstratstabilität zudem Optimierungsspielraum für die biokatalytischen Ansätze.

Für CoTR konnten zwei Kristallstrukturen im Komplex mit NADP⁺ in sehr guten Auflösungen erhalten werden. Aus dem anschließenden Docking der Diketone in die Substratbindeta-

5 Zusammenfassung

sche der Kristallstruktur ließen sich die Substratpräferenz und die Bildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone ableiten. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde zudem ein erster strukturgeleiteter Ansatz zur Optimierung der Stereoselektivität formuliert.

6 Anhang

6.1 Material

Tab. 6.1: Liste der verwendeten Feinchemikalien.

Feinchemikalien	Reinheit	Hersteller
(-)-Carvon	≥99,8%	Sigma-Aldrich (Fluka)
1,4-Cyclohexadion	98,0%	Sigma-Aldrich
(S)-Hajos-Parrish-Keton	97,0%	Sigma-Aldrich
(R)-Hajos-Parrish-Keton	98,0%	abcr
(-)-Menthol	-	Roth
(-)-Menthon	≥99,0%	Sigma-Aldrich (Fluka)
3-Methylcyclohexadiol	98%, cis/trans-Gemisch	Merck
3-Methylcyclohexadion	>98,0%	Merck
(+)-Neomenthol	97,0%	Sigma-Aldrich
NAD	min. 97,0%	Appllichem
NADH Dinatriumsalz	min. 95,0%	Appllichem
NADP Dinatriumsalz	≥97,0%	Roth
NADPH Tetranatriumsalz	min. 96,0%	Appllichem
(S)-Wieland-Miescher-Keton	99,0%	Alfa Aesar
(R)-Wieland-Miescher-Keton	≥98,0%	Sigma-Aldrich
Tropinon	99,0%	Sigma-Aldrich

Tab. 6.2: Liste der Standardgeräte.

Gerät	Modell (Hersteller)
Agarosegel- elektrophorese	Elektrophoresekammer BM100 (Serva), Stromgeber Power Pack 25 (Biometra)
Gel-Dokumentation	Transilluminator (312 nm) TC-312A (Spectroline), Videokamera Modul CCD (Ltf-Labortechnik), Videokopie Prozessor P91E (Mitsubishi)
pH-Meter	inoLab pH Level 1 pMX 3000 MV 870 (WTW Präcitronic)
Photometer	BioSpectrometer basic (Eppendorf) UV/Vis Spektrometer Ultraspec III (Pharmacia)
Polyacrylamid- elektrophorese	PerfectBlue™ Vertikale Doppel-Systeme TWIN S, Model: 45-1010-I, ST305 Electrophoresis Power Supply (PeqLab), Stromgeber Unipack 250 Supply (UNIEQUIP)
Schüttelschränke	Refrigerated Incubator Shaker innova 4230 (New Brunswick Scientific) Refrigerated Incubator Shaker innova 42 (New Brunswick Scientific)
Thermoschüttler	Mixing Block MB-102 (BIOER Technologies) Thermomixer 5436/5437 (Eppendorf) Thermomixer comfort (Eppendorf)

6 Anhang

Fortsetzung Tab. 6.2

Gerät	Modell (Hersteller)
Thermozykler	Thermocycler T3 (Biometra)
	S1000 Thermal Cycler (BioRad)
UV-Lampe	Model CM-10, Fluorescence Analysis Cabinet (254 nm/365 nm) (Sepktroline)

6.2 Methoden

Tab. 6.3: Lyse der Bakterienpellets für die Metallionenaffinitätschromatographie.

Protein	Pellets aus V_{Medium} [L]	resuspendiert in V_{Puffer} [mL]	Lysozymlösung		DNase I [μL]
			[mL]	[U]	
At2g29350	1 (0,5)	40 (20)	4 (2)	910800 (455400)	200 (100)
At2g29350-Varianten	0,5 (0,25)	40 (20)	4 (2)	910800 (455400)	200 (100)
At2g29360	1	40	4	910800	200
At2g29360-Varianten	1 (0,5)	40 (20)	4 (2)	910800 (455400)	200 (100)
CoTR und Varianten	1	40	4	910800	200
At2g29330	1	40	4	910800	200
Chimären und Varianten	0,5	20	2	455400	100

Tab. 6.4: Bedingungen für die Metallionenaffinitätschromatographie der verschiedenen Proteine.

Protein	Pellets aus V_{Medium} [L]	resuspendiert in V_{Puffer} [mL]	Säule	Gradient über X Säulenvolumen
At2g29350	1	40	5 mL	5
At2g29350	0,5	20	5 mL	10
At2g29350-Varianten	0,5	40	5 mL	5
At2g29350(S26A,A48D)	0,25	20	5 mL	10
At2g29360	1	40	1 mL	20
At2g29360-Varianten	1 (0,5)	40 (20)	5 mL	5
CoTR und Varianten	1	40	5 mL	5
CoTR	1	40	5 mL	15
At2g29330	1	40	1 mL	20
Chimären und Varianten	0,5	20	5 mL	10

Tab. 6.5: Verwendete Assypuffer, pH-Werte und Herstellung.

Puffer	pH-Werte	Herstellung
Citrat/Phosphat-Puffer (CPP)	4,5/5,0/5,5	1 M Zitronensäure x H ₂ O-Lösung mit 1 M Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O-Lösung auf gewünschte pH- Werte einstellen
Kaliumphosphatpuffer (KPP)	5,5/6,0/6,4/6,5/7,0/ 7,5	1 M-Lösungen von K ₂ HPO ₄ und KH ₂ PO ₄ für gewünschte pH-Werte mischen

6 Anhang

Fortsetzung Tab. 6.5

Puffer	pH-Werte	Herstellung
Tris/HCl-Puffer (THP)	7,5/8,0/8,5/9,0	1 M-Tris-Base-Lösung mit konz. Salzsäure auf gewünschte pH-Werte einstellen
Glycin/NaOH-Puffer (GNP)	9,0/9,5/10,0	1 M-Glycin-Lösung mit 50%-Natronlauge auf gewünschte pH-Werte einstellen

Tab. 6.6: Bedingungen der Aktivitätsmessungen für die Reduktion.

Enzym/Variante	c (3MCH) [mM]	Cosubstrat/ c [μM]	c (Protein) [μg/mL]	Zeit [min]
At2g29350(A48D)	10	NADH/400	20	0-6
At2g29350(S26A,A48D)	10	NADH/400	20	1,5-6
At2g29350(S26A,K27S,A48D)	10	NADH/400	20	0-6
At2g29350(S26A,A48D,R49I)	10	NADH/400	20	0-6
At2g29350(S26A,K27S,A48D,D50A)	10	NADH/400	20	0-6
At2g29350(K27S)	5	NADPH/200	5	2-5
At2g29350(V103A)	5	NADPH/200	5	0-1
At2g29360(A49D)	10	NADH/400	20	0-6
At2g29360(S27A,A49D)	10	NADH/400	20	0-6
CoTR(A49D)	1, 5	NAD(P)H/250	2,5	0-6
CoTR(S27A,A49D)	1, 5	NAD(P)H/250	2,5	0-6
CG2	5	NADPH/200	10	1-4
CG2(T109F)	5	NADPH/200	5	1-4
CG2(S27A,A49D,T109F)	5	NADH/200	25	0-6
CG3	5	NADPH/200	20	0-6
CG3(T109F)	5	NADPH/200	30	0-6

Tab. 6.7: Bedingungen für die Messung der pH-Abhängigkeit der spezifischen Aktivität (Reduktion).

Enzym/Variante	c (3MCH) [mM]	Cosubstrat/ c [μM]	c(Protein) [μg/mL]	Zeit [min]
At2g29350	5	NADPH/200	2,5	0-6
At2g29350(S26A,A48D)	10	NADH/400	20	1,5-6
At2g29350(S26A,K27S,A48D)	10	NADH/400	20	0-6
At2g29350(S26A,A48D,R49I)	10	NADH/400	20	0-6
At2g29350(S26A,K27S,A48D,D50A)	10	NADH/400	20	0-6
At2g29350(K27S)	5	NADPH/200	5	2-5
At2g29350(V103A)	5	NADPH/200	5	0-1
At2g29360(S27A,A49D)	10	NADH/400	20	0-6
CoTR	1	NADPH/200	5	0-6
CoTR(A49D)	1	NADH/250	2,5	0-2
CoTR(S27A,A49D)	1	NADH/250	2,5	0-2

6 Anhang

Fortsetzung Tab. 6.7

Enzym/Variante	c (3MCH) [mM]	Cosubstrat/ c [μM]	c(Protein) [μg/mL]	Zeit [min]
CoTR(A206S)	1	NADPH/200	5	0-6
CoTR(S27A,A49D,A206S)	1	NADH/250	2,5	0-2
CG1	5	NADPH/200	10	1-4
CG1(T109F)	5	NADPH/200	5	1-4
CG1(S27A,A49D,T109F)	5	NADH/200	25	0-6
CG2	5	NADPH/200	20	0-6
CG2(T109F)	5	NADPH/200	30	0-6

Tab. 6.8: Bedingungen für die Messung der pH-Abhängigkeit der spezifischen Aktivität (Oxidation).

Enzym/Variante	c (3MCHol) [mM]	Cosubstrat/ c [μM]	c(Protein) [μg/mL]	Zeit [min]
At2g29350	5	NADP ⁺ /400	2,5	3-6
At2g29350(S26A,A48D)	10	NAD ⁺ /600	20	3-6
At2g29350(K27S)	5	NADP ⁺ /400	15	3-6
At2g29350(V103A)	5	NADP ⁺ /400	15	3-6
At2g29360(S27A,A49D)	10	NAD ⁺ /600	20	0-6
CoTR	2	NADP ⁺ /400	15	0-6
CoTR(A49D)	2	NAD ⁺ /250	10	0-6
CoTR(S27A,A49D)	2	NAD ⁺ /250	10	0-6
CoTR(A206S)	2	NADP ⁺ /200	15	0-6
CoTR(S27A,A49D,A206S)	2	NAD ⁺ /250	10	0-6

Tab. 6.9: Bedingungen für die Messung der spezifischen Aktivität abhängig von der Temperatur.

Enzym/Variante	pH-Wert	c (3MCH) [mM]	Cosubstrat/ c [μM]	c(Protein) [μg/mL]	Zeit [min]
At2g29350	5,5 (KPP)	5	NADPH/200	5	0-3
At2g29350(S26A,A48D)	7,5 (KPP)	10	NADH/400	20	0-4
At2g29360	6,0 (KPP)	5	NADPH/200	7,5	0-6
At2g29360(S27A,A49D)	7,5 (KPP)	10	NADH/400	20	0-6
CoTR	5,0 (CPP)	1	NADPH/200	5	0-6
CoTR(A49D)	5,0 (CPP)	1	NADH/250	2,5	0-3
CoTR(S27A,A49D)	5,0 (CPP)	1	NADH/250	2,5	0-3

Tab. 6.10: Bedingungen für die Messung der Aktivität mit den Diketonen.

Enzym/Variante	pH-Wert	c (Diketon) [mM]	Cosubstrat/ c [μM]	c(Protein) [μg/mL]	Zeit [min]
At2g29350	5,5 (KPP)	5	NADPH/200	5	0-6
At2g29350(S26A,A48D)	7,5 (KPP)	10	NADH/400	20	0-6

6 Anhang

Fortsetzung Tab. 6.10

Enzym/Variante	pH-Wert	c (Diketon) [mM]	Cosubstrat/ c [μ M]	c(Protein) [μ g/mL]	Zeit [min]
At2g29360	6,0 (KPP)	5	NADPH/200	7,5	0-6
At2g29360(S27A,A49D)	7,5 (KPP)	10	NADH/400	20	0-6
CoTR	5,0 (CPP)	5	NADPH/200	7,5	0-6
CoTR(A49D)	5,0 (CPP)	5	NADH/400	7,5	0-6
CoTR(S27A,A49D)	5,0 (CPP)	5	NADH/400	7,5	0-6
At2g29330	5,0 (CPP)	5	NADH/200	7,5	0-6

Tab. 6.11: Bedingungen der Enzymkinetiken. Jeweils vier Wiederholungen (Ausnahme CoTR/3MCH: drei Wiederholungen) und vier technische Replikate (n = 4).

Kinetik	Komponente in Sättigung	c(Enzym)	Auswertung	
			Messzeit	Konzentrationen
At2g29350 bei pH 5,5 (KPP)				
3MCH	0,2 mM NADPH	1,5 μ g/mL	0-4 min	0,1-2, 4-9 mM
(S)-WMK	0,2 mM NADPH	4 μ g/mL	1-4 min	0,1-9 mM
(S)-HPK	0,2 mM NADPH	4 μ g/mL	1-4 min	0,1-9 mM
(R)-HPK	0,2 mM NADPH	10 μ g/mL	0-6 min	0,1-9 mM
At2g29350(V103A) bei pH 6,4 (KPP)				
NADPH	5 mM 3MCH	4 μ g/mL	0-1 min	0,025-0,8 mM
3MCH	0,8 mM NADPH	5 μ g/mL	1-6 min	0,1-9 mM
(S)-WMK	0,8 mM NADPH	12 μ g/mL	3,5-6 min	0,5-9 mM, 15 mM
(S)-HPK	0,8 mM NADPH	12 μ g/mL	2,5-6 min	0,5-9 mM, 15 mM
At2g29350(S26A,A48D) pH 7,5 (KPP)				
NADH	13 mM 3MCH	10 μ g/mL	0-8 min	0,05-0,8 mM
3MCH	0,8 mM NADH	7,5 μ g/mL	5-8 min	1-10, 12, 15, 17, 20 mM
NAD ⁺	15 mM 3MCHol	20 μ g/mL	7-8 min	0,2-1, 1,5, 2, 2,5, 3 mM
3MCHol	2 mM NAD ⁺	20 μ g/mL	7-8 min	1-10, 15, 20 mM
(S)-WMK	0,8 mM NADH	12 μ g/mL	5-10 min	0,5-10, 15, 20 mM
(S)-HPK	0,8 mM NADH	12 μ g/mL	5-10 min	0,5-10, 15, 20 mM
At2g29350(K27S) bei pH 6,0 (KPP)				
NADPH	3 mM 3MCH	6 μ g/mL	0-1,5 min	0,05-0,8 mM
3MCH	0,8 mM NADPH	6 μ g/mL	2,5-8 min	0,1-9 mM

6 Anhang

Fortsetzung Tab. 6.11

Kinetik	Komponente in Sättigung	c(Enzym)	Auswertung	
			Messzeit	Konzentrationen
CoTR bei pH 5,0 (CPP)				
3MCH	0,6 mM NADH	10 µg/mL	0-5 min	0,1-9 mM
(R)-WMK	0,2 mM NADPH	10 µg/mL	0-2 min	0,1-2, 4-8 mM
(R)-HPK	0,2 mM NADPH	12 µg/mL	0-8 min	0,1-6, 8-9 mM
(S)-WMK	0,2 mM NADPH	10 µg/mL	0-6 min	0,1-9 mM
CoTR(A49D) bei pH 5,0 (CPP)				
NADH	2 mM 3MCH	1,25 µg/mL	0-4 min	0,01-0,8 mM
3MCH	0,7 mM NADH	2,5 µg/mL	0-4 min	0,1-9 mM
NADPH	5 mM 3MCH	2,5 µg/mL	0-3 min	0,01-0,8 mM
3MCH	0,8 mM NADPH	3 µg/mL	0-6 min	0,25-2, 4-9 mM
(R)-WMK	0,7 mM NADH	8 µg/mL	0-6 min	0,15-9 mM
(S)-WMK	0,7 mM NADH	12 µg/mL	0-8 min	0,25-9 mM
(R)-HPK	0,7 mM NADH	30 µg/mL	0-8 min	0,25-0,75, 2-4, 6-9 mM
CoTR(S27A,A49D) bei pH 5,0 (CPP)				
NADH	0,5 mM 3MCH	1,25 µg/mL	0-2 min	0,01-0,8 mM
3MCH	0,7 mM NADH	2,5 µg/mL	0-3 min	0,1-9 mM
NADPH	5 mM 3MCH	2,5 µg/mL	0-6 min	0,01-0,8 mM
3MCH	0,8 mM NADPH	3 µg/mL	0-6 min	0,5-9 mM
(R)-WMK	0,7 mM NADH	8 µg/mL	0-6 min	0,15-9 mM
(S)-WMK	0,7 mM NADH	12 µg/mL	0-8 min	0,25-9 mM
(R)-HPK	0,7 mM NADH	30 µg/mL	0-8 min	0,25-0,75, 2-9 mM

Tab. 6.12: Bedingungen für die GCMS-Ansätze mit 3MCH und 3MCHol.

Enzym/Variante	Reduktion		Oxidation		c (Protein) [µg/mL]
	Puffer/pH	Cosubstrat	Puffer/pH	Cosubstrat	
At2g29350	KPP/5,5	NADPH	GNP/9,0	NADP ⁺	75
K27S	KPP/6,0	NADPH	THP/8,5	NADP ⁺	75
S26A,A48D	KPP/7,5	NADH	GNP/9,0	NAD ⁺	150
S26A,K27S,A48D	KPP/7,5	NADH	-	-	150
S26A,A48D,R49I	KPP/7,5	NADH	-	-	150
S26A,A48D,V103A	KPP/7,0	NADH	-	-	150
S26A,K27S,A48D,D50A	KPP/7,5	NADH	-	-	150
V103A	KPP/6,4	NADPH	GNP/9,0	NAD ⁺	75

6 Anhang

Fortsetzung Tab. 6.12

Enzym/Variante	Reduktion		Oxidation		c (Protein) [µg/mL]
	Puffer/pH	Cosubstrat	Puffer/pH	Cosubstrat	
CoTR	CPP/5,0	NADPH	GNP/10,0	NADP ⁺	150
A49D	CPP/5,0	NADH	GNP/10,0	NAD ⁺	75
S27A,A49D	CPP/5,0	NADH	GNP/10,0	NAD ⁺	75
A206S	KPP/5,5	NADPH	GNP/10,0	NADP ⁺	150
S27A,A49D,A206S	CPP/5,0	NADH	GNP/10,0	NAD ⁺	75
At2g29360(S27A,A49D)	KPP/6,5	NADH	THP/8,5	NAD ⁺	150
CG2	KPP/6,4	NADPH	-	-	150
T109F	KPP/6,0	NADPH	-	-	150
S27A,A49D,T109F	KPP/7,5	NADH	-	-	150
CG3	KPP/6,4	NADPH	-	-	150
T109F	KPP/6,0	NADPH	-	-	150

Tab. 6.13: Bedingungen für die GCMS-Ansätze mit den Diketonen und Hydroxyketonen.

Enzym/Variante	Reduktion		Oxidation		c (Protein) [µg/mL]
	Puffer/pH	Cosubstrat	Puffer/pH	Cosubstrat	
At2g29350	KPP/5,5	NADPH	GNP/9,0	NADP ⁺	75
S26A,A48D	KPP/7,5	NADH	GNP/9,0	NAD ⁺	150
V103A	KPP/6,4	NADPH	GNP/9,0	NADP ⁺	75
CoTR	CPP/5,0	NADPH	GNP/10,0	NADP ⁺	150
CoTR	CPP/5,0	NADH	-	-	150
A49D	CPP/5,0	NADH	GNP/10,0	NAD ⁺	75
S27A,A49D	CPP/5,0	NADH	GNP/10,0	NAD ⁺	75
A206S	KPP/5,5	NADPH	GNP/10,0	NADP ⁺	150
S27A,A49D,A206S	CPP/5,0	NADH	GNP/10,0	NAD ⁺	75
CG2	KPP/6,4	NADPH	-	-	150
T109F	KPP/6,0	NADPH	-	-	150
S27A,A49D,T109F	KPP/7,5	NADH	-	-	150
CG3	KPP/6,4	NADPH	-	-	150
T109F	KPP/6,0	NADPH	-	-	150

Tab. 6.14: Kristallisationsbedingungen des fine screenings von CoTR. Proteinansätze 1.-5. (Tab. 2.18a), 15 °C. (*) Ansätze wurden zusätzlich bei RT durchgeführt.

Bedingungen	pH-Wert	Ansatz CoTR	c (CoTR) [mg/mL]
1.* 4M NaCO ₂ H		1., 2.	11, 13, 15
2.* 0,1M Tris/HCl, 8% m/V PEG 8000	8,5 (± 0,1; ± 0,2; ± 0,4)	1., 2.	11, 12, 13, 15
3.* 0,1M NaOAc, 8% m/V PEG 4000	4,6 (± 0,2; ± 0,4)	2.	11, 13, 15
4.* 2M NaCO ₂ H 0,1M NaOAc	4,6 (± 0,2; ± 0,4)	2.	11, 13, 15

6 Anhang

Fortsetzung Tab. 6.14

	Bedingungen	pH-Wert	Ansatz CoTR	c (CoTR) [mg/mL]
5.*	0,05 M Tris/HCl, 20% m/V PEG 3350	8,5 (± 0,1; ± 0,2; ± 0,4)	1.	11, 13, 15
6.	0,1 M Na-MES, 0,2 M MgCl ₂ , 10% m/V PEG 4000	6,5 (± 0,2; ± 0,4)	2.	5, 7, 9, 11, 13, 15
7.	0,1 M Tris/HCl, 16% m/V PEG 10000	8,5 (± 0,2; ± 0,4)	2., 3., 4., 5.	11, 13, 15
8.	0,05 M Na-MES, 30% V/V Glycerol, 30% m/V PEG 1500	6,5 (± 0,2; + 0,3; ± 0,4)	3., 4.	11, 13, 15
9.	0,1 M HEPES, 0,1 M NaCl, 1,6 M (NH ₄) ₂ SO ₄	7,5 (± 0,2; ± 0,4)	3.	11, 13, 15
10.	0,1 M Tris/HCl, 1,5 M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 12% V/V Glycerol	8,5 (± 0,2; ± 0,4)	4.	11, 13, 15
11.	10% m/V PEG 1000, 10% m/V PEG 8000		4.	11, 13, 15
12.	35% V/V Dioxan		2., 3., 4., 5.	11, 13, 15
13.	0,05 M Zitronensäure, 4% m/V PEG 3350	5,0 (± 0,2; - 0,3; ± 0,4; - 0,5)	3., 4., 5.	11, 13, 15
14a.	0,1 M HEPES, 4,3 M NaCl	7,5 (± 0,2; ± 0,4)	3., 4., 5.	11, 13, 15
14b.	0,1 M HEPES, 3,0 M NaCl	7,5 (± 0,2)	3., 4., 5.	11, 13, 15
14c.	0,1 M HEPES, 2,0 M NaCl	7,5 (± 0,2)	3., 4., 5.	11, 13, 15

Tab. 6.15: Substrat- und Cosubstratkonzentrationen für das erweiterte fine screening. Bedingungen (vergl. Tab. 6.14): **3.:** pH 5,0; 13 mg/mL CoTR. **5.:** pH 8,4; 13 mg/mL CoTR. **8.:** pH 6,7-6,9; 7, 10, 13 mg/mL CoTR. **11.:** 11 mg/mL CoTR. **12.:** 13 mg/mL CoTR. **13.:** pH 4,6; 15 mg/mL CoTR.

	Substrat	Konzentration [mM]	Cosubstrat	Konzentration [mM]
3.	-	-	NAD ⁺	2
3.	-	-	NAD ⁺	4
3.	(R)-WMK	25	NAD ⁺	2
3.	(R)-WMK	0,5; 25; 50; 100; 150	NADP ⁺	0,5
3.	(R)-HPK	0,5; 25; 50; 100; 150	NADP ⁺	0,5
3.	Tropinon	0,5; 25; 50; 100; 150	NADP ⁺	0,5
3.	1,4-Cyclohexadion	0,5; 25; 50; 100; 150	NADP ⁺	0,5
3.	(-)-Menthon	0,5; 25; 50; 100; 150	NADP ⁺	0,5
3.	(-)-Carvon	0,5; 25; 50; 100; 150	NADP ⁺	0,5
5.	(R)-WMK	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
5.	(S)-WMK	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
5.	(R)-HPK	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
5.	Tropinon	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
5.	(-)-Menthon	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
5.	(-)-Carvon	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5

6 Anhang

Fortsetzung Tab. 6.15

	Substrat	Konzentration [mM]	Cosubstrat	Konzentration [mM]
5.	(<i>R</i>)-WMK	0,5; 25; 50; 100; 125	NAD ⁺	10
5.	Tropinon	0,5; 25; 50; 100; 125	NAD ⁺	10
5.	(-)-Carvon	0,5; 25; 50; 100; 125	NAD ⁺	10
5.	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2	0,5; 25; 50; 100; 125	NADPH	2
5.	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2	0,5; 25; 50; 100; 125	NADH	10
5.	Neomenthol	0,5; 25; 50; 100; 125	NADPH	2
5.	Neomenthol	0,5; 25; 50; 100; 125	NADH	10
8.	Tropinon	50	NADP ⁺	0,43, 0,51, 0,58
8.	1,4-Cyclohexadion	50	NADP ⁺	0,43, 0,51, 0,58
11.	(<i>R</i>)-WMK	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
11.	(<i>S</i>)-WMK	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
11.	(<i>R</i>)-HPK	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
11.	Tropinon	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
11.	(-)-Menthon	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
11.	(-)-Carvon	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
11.	(<i>R</i>)-WMK	0,5; 25; 50; 100; 125	NAD ⁺	10
11.	Tropinon	0,5; 25; 50; 100; 125	NAD ⁺	10
11.	(-)-Carvon	0,5; 25; 50; 100; 125	NAD ⁺	10
11.	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2	0,5; 25; 50; 100; 125	NADPH	2
11.	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2	0,5; 25; 50; 100; 125	NADH	10
11.	Neomenthol	0,5; 25; 50; 100; 125	NADPH	2
11.	Neomenthol	0,5; 25; 50; 100; 125	NADH	10
12.	(<i>R</i>)-WMK	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
12.	(<i>S</i>)-WMK	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
12.	(<i>R</i>)-HPK	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
12.	Tropinon	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
12.	(-)-Menthon	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
12.	(-)-Carvon	0,5; 25; 50; 100; 125	NADP ⁺	0,5
12.	(<i>R</i>)-WMK	0,5; 25; 50; 100; 125	NAD ⁺	10
12.	Tropinon	0,5; 25; 50; 100; 125	NAD ⁺	10
12.	(-)-Carvon	0,5; 25; 50; 100; 125	NAD ⁺	10
12.	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2	0,5; 25; 50; 100; 125	NADPH	2
12.	(4 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2	0,5; 25; 50; 100; 125	NADH	10
12.	Neomenthol	0,5; 25; 50; 100; 125	NADPH	2
12.	Neomenthol	0,5; 25; 50; 100; 125	NADH	10
13.	Tropinon	25; 50	NADP ⁺	0,58
13.	1,4-Cyclohexadion	25; 50	NADP ⁺	0,58
13.	(-)-Carvon	25; 50	NADP ⁺	0,58

6.3 Ergebnisse

6.3.1 Proteinproduktion, -reinigung und -ausbeute

Tab. 6.16: Gegenüberstellung der Expressions- und Aufreinigungsbedingungen der Wildtyp-Enzyme At2g29350 und CoTR. (*) Bereiche beziehen sich auf mehrere Aufreinigungen

Protein		alte Bedingungen (Reinhardt, 2014)	neue Bedingungen
At2g29350	Expression:	OD ₆₀₀ 0,6-0,8, 4-5 h bei 37 °C, 250 rpm	OD ₆₀₀ 0,7-0,9, 4,5 h bei 37 °C, 250 rpm
	Lyse:	640.000 U Lysozym, 30 min, 60 s Ultraschall	910.800 U Lysozym, 30 min, 90 s Ultraschall
	Aufreinigung:	1 mL His-Trap-Säule, Gradient: 20 SV	5 mL His-Trap-Säule, Gradient: 5 SV
	Ausbeute	16-23 mg/L*	50-57 mg/L*
CoTR	Expression:	OD ₆₀₀ 0,6-0,8, 16 h bei 25 °C, 250 rpm	OD ₆₀₀ 0,7-1,0, 4,5 h bei 37 °C, 250 rpm
	Lyse:	640.000 U Lysozym, 30 min, 60 s Ultraschall	910.800 U Lysozym, 30 min, 90 s Ultraschall
	Aufreinigung:	1 mL His-Trap-Säule, Gradient: 20 SV	5 mL His-Trap-Säule, Gradient: 5 SV
	Ausbeute	9-16 mg/L*	52-66 mg/L*

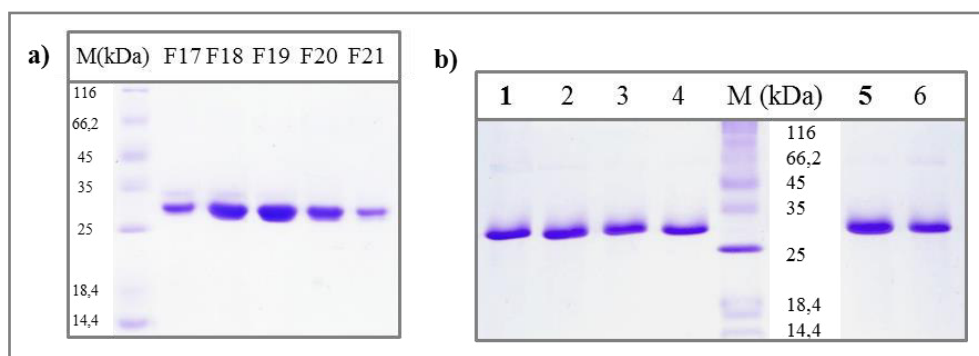


Abb. 6.1: SDS-Gele von CoTR und den Chimären. a) Fraktionen von CoTR nach der Aufreinigung mit einem Gradienten über 15 Säulenvolumen. F17: 0,9 µg; F18: 2,3 µg; F19: 2,7 µg; F20: 1,1 µg; F21: 0,5 µg. b) Vergleich der Reinheit der Proteinchargen der Chimären und Varianten: 1: CG1; 2: CG1(T109F); 3: CG1(A49D,-T109F); 4: CG1(S27A,A49D,T109F); 5: CG2; 6: CG2(T109F). Jeweils 1,3 µg Protein aufgetragen.

6 Anhang

Tab. 6.17: Proteinausbeute der Wildtyp-Enzyme im Vergleich zu ihren Enzymvarianten und Chimären.
 (*) Aufreinigung über 1 mL His-Trap Säule

Protein/Variante	Pellets aus V_{Medium} [L]	Proteinausbeute	Proteinausbeute auf 1 L
At2g29350	1	50-57 mg	50-57 mg
At2g29350	0,5	13,4 mg	26,8 mg
A48D	0,5	48,7 mg	97,4 mg
K27S,A48D	0,5	59,3 mg	118,6 mg
S26A,A48D	0,5	57,3 mg	114,6 mg
S26A,A48D	0,25	19,9 mg	79,6 mg
S26A,K27S,A48D	0,5	60,6 mg	121,2 mg
S26A,A48D,R49I	0,5	63,6 mg	127,2 mg
S26A,K27S,A48D,R49I	0,5	44,2 mg	88,4 mg
S26A,A48D,V103A	0,5	50,0 mg	100,0 mg
S26A,K27S,A48D,D50A	0,5	43,9 mg	87,8 mg
K27S	0,5	62,6 mg	125,3 mg
V103A	0,25	8,5 mg	34,0 mg
At2g29360*	1	12,5 mg	12,5 mg
A49D	0,5	14,0 mg	28,0 mg
S27A,A49D	1	64,9 mg	64,9 mg
CoTR	1	52-66 mg	52-66 mg
A49D	1	68,4 mg	68,4 mg
S27A,A49D	1	67,0 mg	67,0 mg
A206S	1	46,3 mg	46,3 mg
S27A,A49D,A206S	1	88,6 mg	88,6 mg
CG1	0,5	18,2 mg	36,4 mg
T109F	0,5	20,0 mg	40,0 mg
A49D,T109F	0,5	16,9 mg	33,8 mg
S27A,A49D,T109F	0,5	16,6 mg	33,2 mg
CG2	0,5	31,5 mg	63,0 mg
T109F	0,5	16,3 mg	32,6 mg
At2g29330*	1	26,9 mg	26,9 mg

6.3.2 Abhängigkeit der Enzymaktivität vom pH-Wert

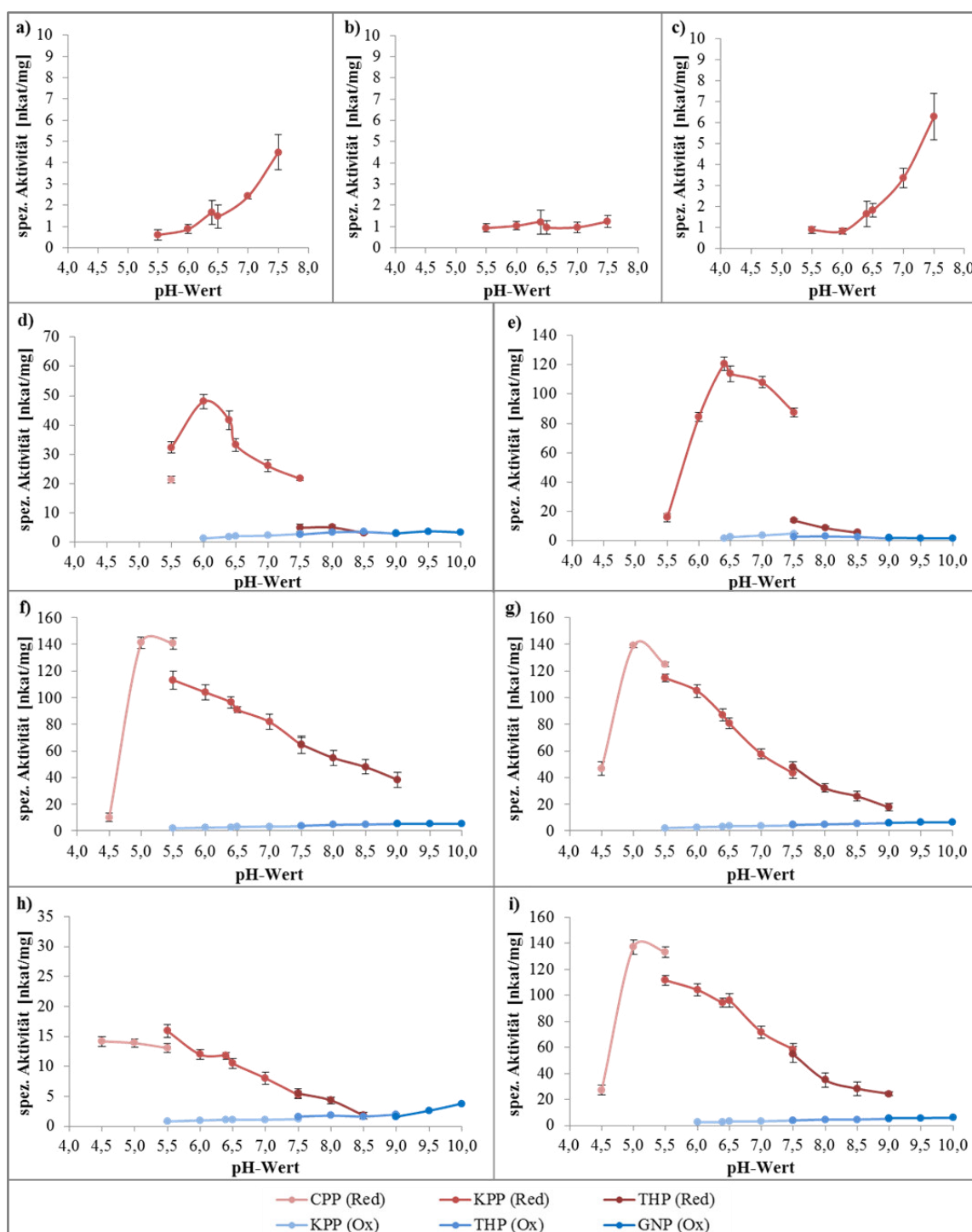


Abb. 6.2: pH-Abhängigkeit der Aktivität der Enzymvarianten von At2g29350 und CoTR. Reduktion: 10 mM 3MCH, 0,4 mM NADH; a) At2g29350(S26A,K27S,A48D); b) At2g29350(S26A,A48D,R49I); c) At2g29350(S26A,K27S,A48D,D50A). Reduktion (rot): 5 mM 3MCH, 0,2 mM NADPH/Oxidation (blau): 5 mM 3MCHol, 0,4 mM NADP⁺; d) At2g29350(K27S); e) At2g29350(V103A). Reduktion (rot): 1 mM 3MCH, 0,2 mM NADPH/Oxidation (blau): 2 mM 3MCHol, 0,4 mM NADP⁺; f) CoTR(A49D); g) CoTR(S27A,A49D); h) CoTR(A206S); i) CoTR(S27A,A49D,A206S). Reduktion: pH 4,5-9,0; Oxidation: pH 5,5-10,0; 30 °C. Photometrische Messung der Absorptionsänderung von NAD(P)(H) bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit vier technischen Replikaten (n = 4). CPP: Citrat/Phosphat-Puffer; KPP: Kaliumphosphatpuffer; THP: Tris/HCl-Puffer; GNP: Glycin/NaOH-Puffer.

6 Anhang

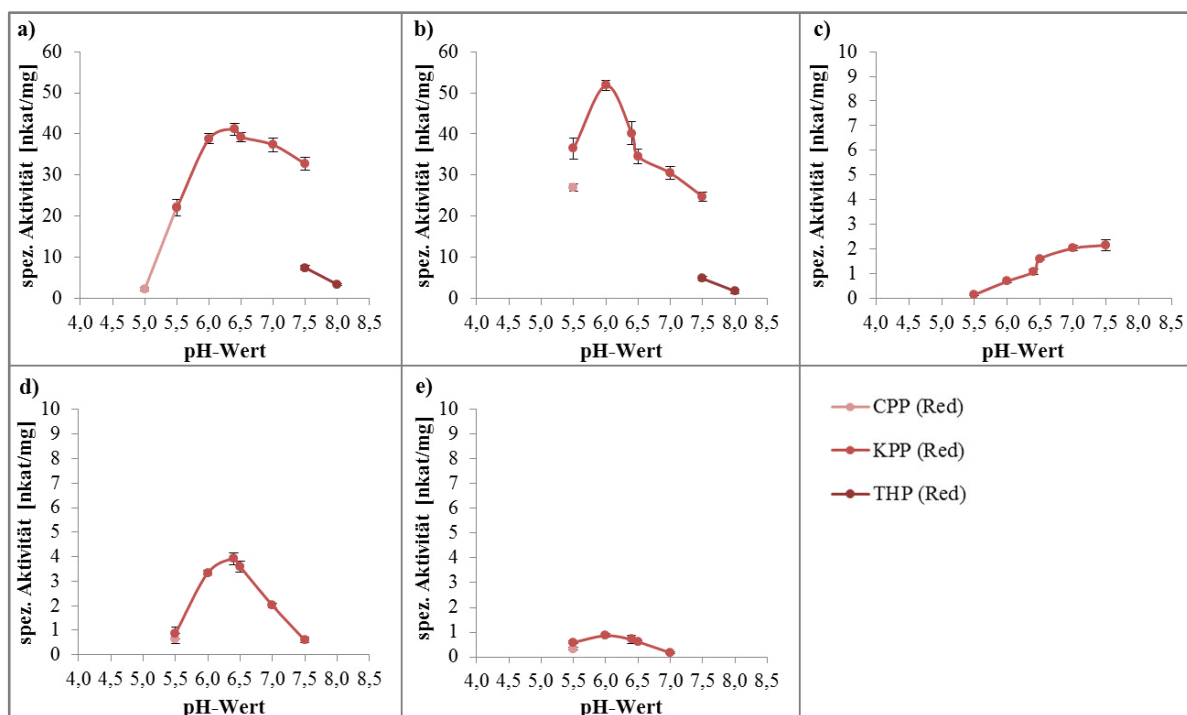


Abb. 6.3: pH-Abhängigkeit der Aktivität von CG1 und CG2 und ihren Enzymvarianten. Reduktion: 5 mM 3MCH, 0,2 mM NAD(P)H: a) CG1; b) CG1(T109F); c) CG1(S27A,A49D,T109F); d) CG2; e) CG2(T109F). pH 4,5-9,0; 30 °C. Photometrische Messung der Absorptionsänderung von NAD(P)(H) bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit vier technischen Replikaten (n = 4). CPP: Citrat/Phosphat-Puffer; KPP: Kaliumphosphatpuffer; THP: Tris/HCl-Puffer.

6.3.3 Stabilitätstest für die analytische Ultrazentrifugation und Gelfiltration

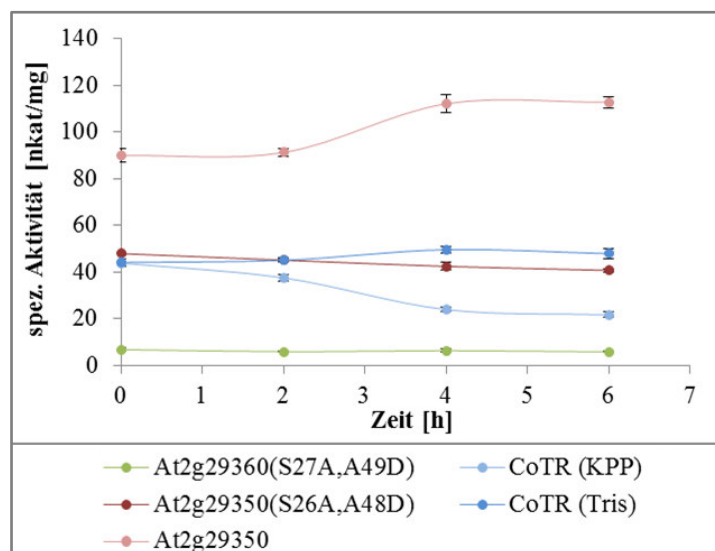


Abb. 6.4: Stabilitätstest der Proteine für die analytische Ultrazentrifugation und Gelfiltration. Puffer für At2g29350, At2g29350(S26A,A48D), At2g29360(S27A,A49D) und CoTR (KPP): 25 mM KPP pH 7,0, 125 mM NaCl, 0,5 mM TCEP. Puffer für CoTR (Tris): 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM NaCl, 0,5 mM TCEP. Inkubation über 6 h bei 20 °C. Aktivitätsmessung: At2g29350: 5 mM 3MCH, 0,2 mM NADPH; Enzymvarianten: 10 mM 3MCH, 0,4 mM NADH; CoTR: 1 mM 3MCH, 0,2 mM NADPH. pH-Optimum der Proteine, 30 °C. Photometrische Messung der Absorptionsänderung von NAD(P)(H) bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus zwei Wiederholungen mit vier technischen Replikaten (n = 4).

6.3.4 Produktanalyse mittels GCMS

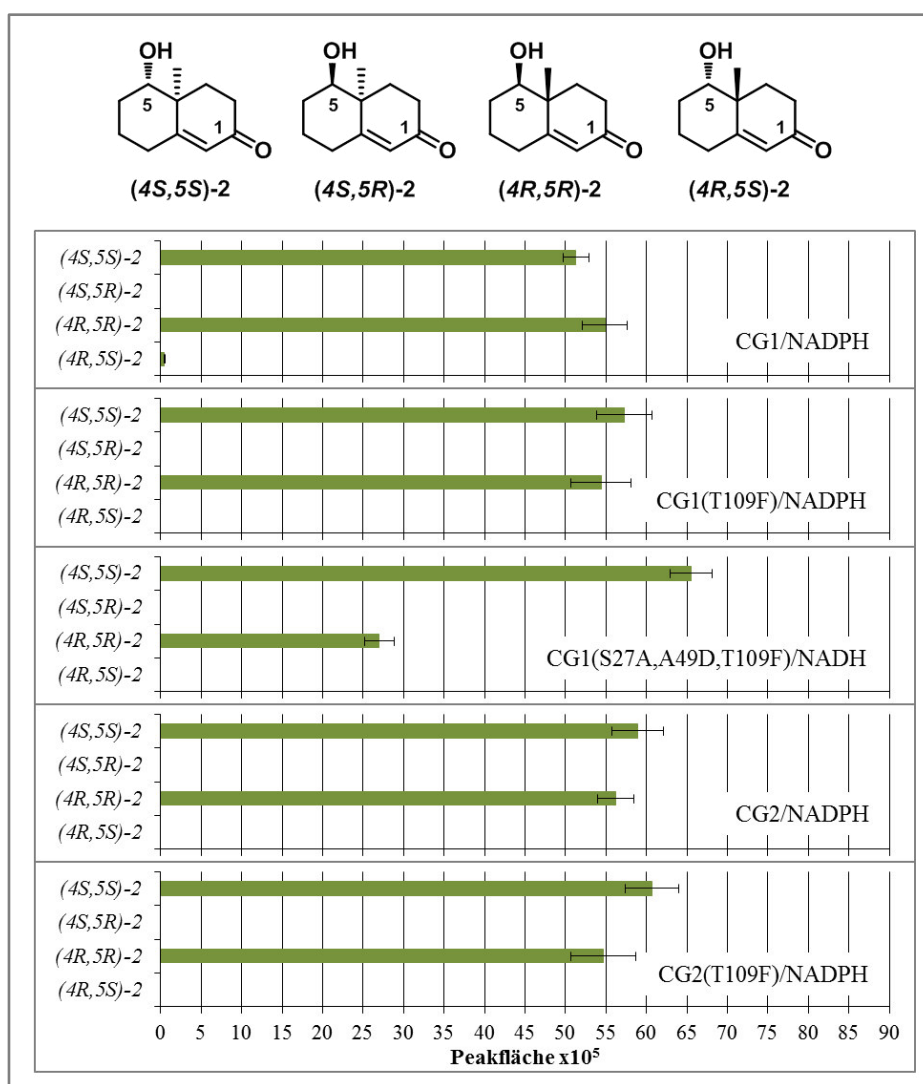


Abb. 6.5: Semiquantitative Auswertung der enzymatischen Bildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone durch CG1 und CG2 sowie ihre Enzymvarianten ausgehend von den (*S*)- und (*R*)-Enantiomeren des Wieland-Miescher-Ketons. Ansatzbedingungen: 75 $\mu\text{g/mL}$ (blau) oder 150 $\mu\text{g/mL}$ (grün) Enzym, 1 mM Substrat, 3 mM NAD(P)H, pH-Optima der Enzyme, 3 h, 350 rpm, 30 °C. Extraktion mit Essigsäureethylester. Messung: GCMS, drei Wiederholungen mit drei technischen Replikaten ($n = 3$), Angabe der Mittelwerte der Peakflächen mit Standardabweichung.

6 Anhang

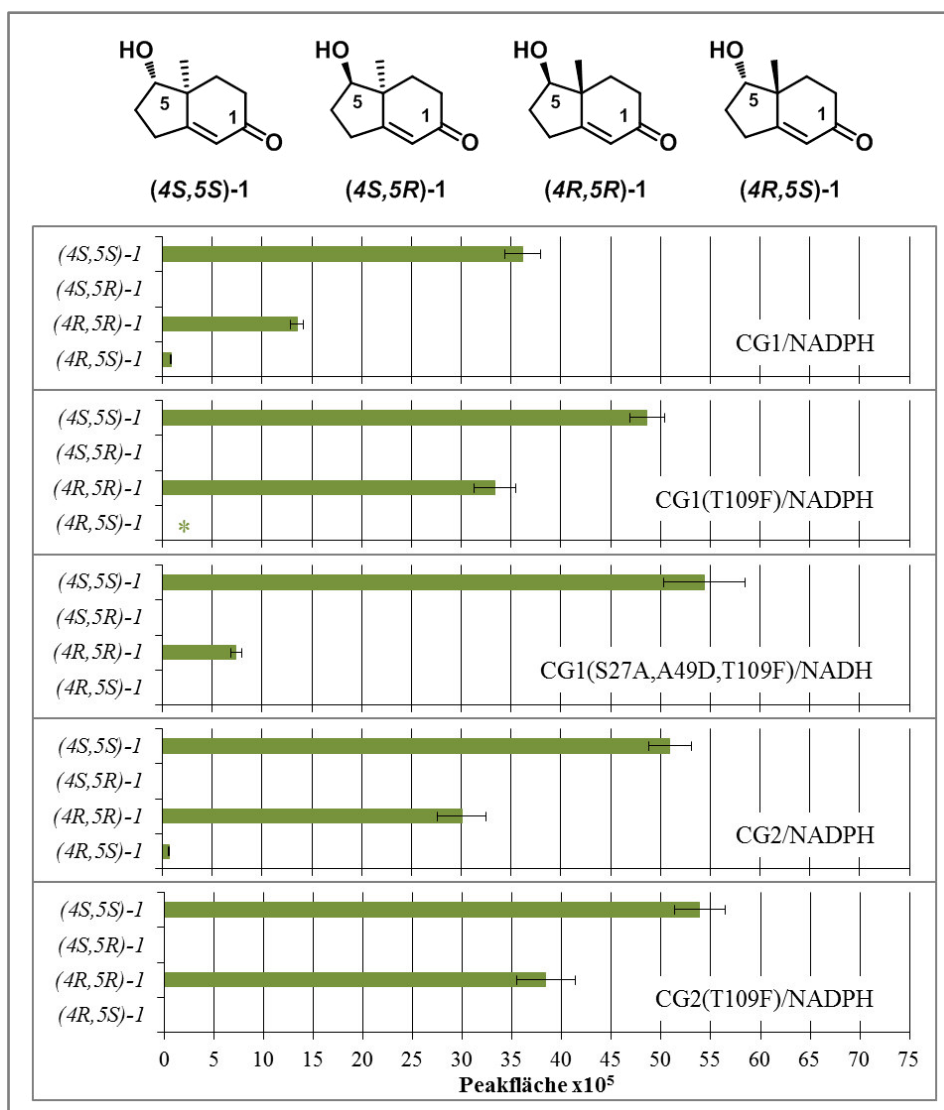


Abb. 6.6: Semiquantitative Auswertung der enzymatischen Bildung der α,β -ungesättigten Hydroxyketone durch CG1 und CG2 sowie ihre Enzymvarianten ausgehend von den (S)- und (R)-Enantiomeren des Hajos-Parrish-Ketons. Ansatzbedingungen: 75 $\mu\text{g/mL}$ (blau) oder 150 $\mu\text{g/mL}$ (grün) Enzym, 1 mM Substrat, 3 mM NAD(P)H, pH-Optima der Enzyme, 3 h, 350 rpm, 30 °C. Extraktion mit Essigsäureethylester. Messung: GCMS, drei Wiederholungen mit drei technischen Replikaten ($n = 3$), Angabe der Mittelwerte der Peakflächen mit Standardabweichung. (*) Produkt konnte nachgewiesen werden, lag aber unterhalb des Quantifizierungslimits (LOQ: Signal:Rausch-Verhältnis von >5 , Peakfläche von ≥ 40.000 und maximale prozentuale Standardabweichung von 12%).

6 Anhang

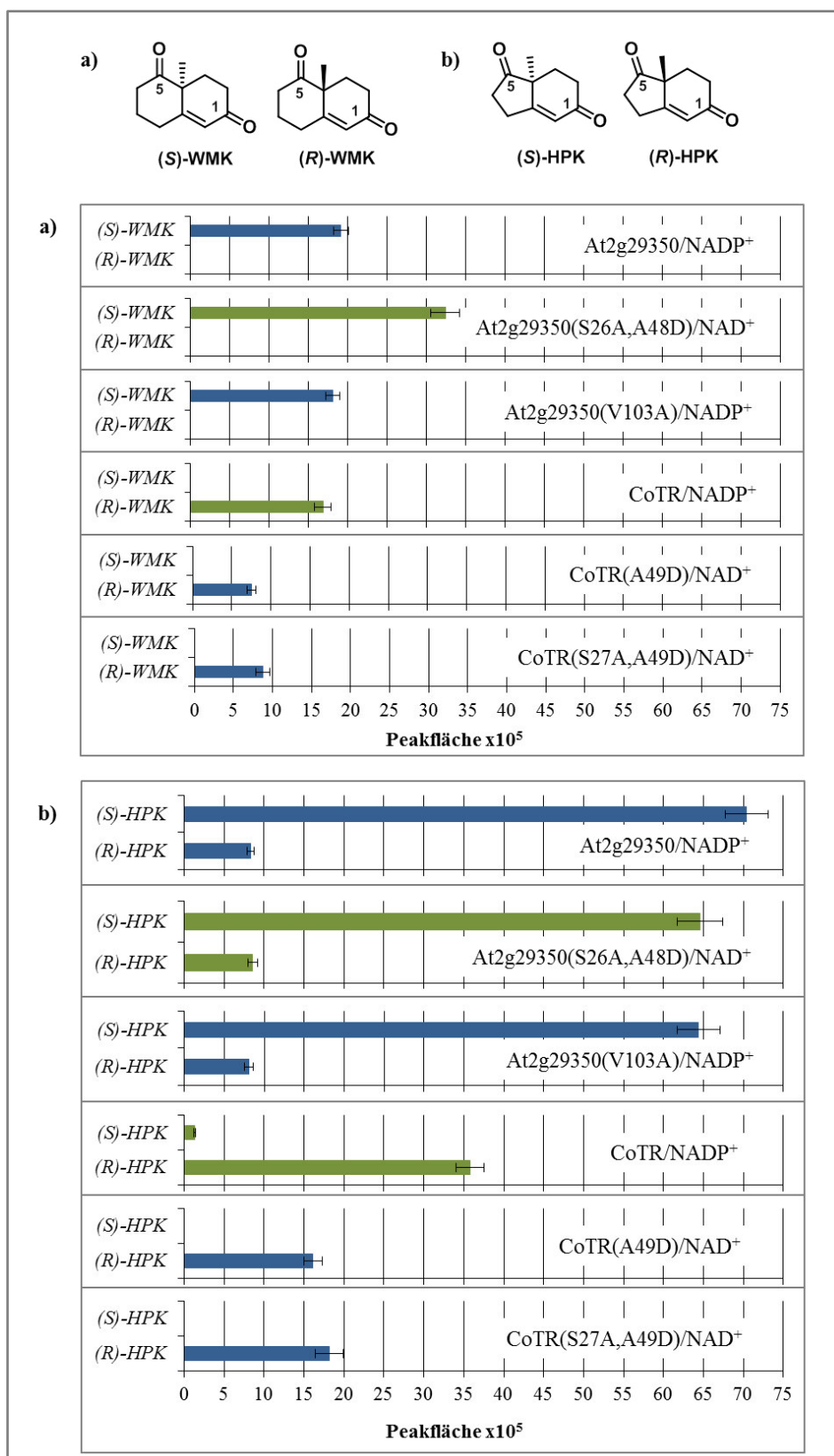
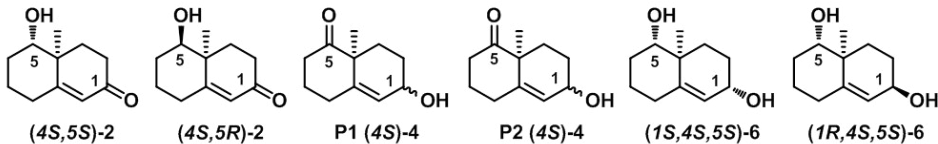
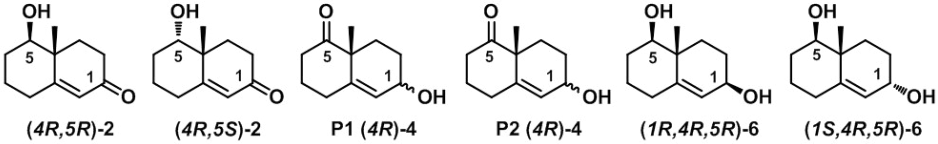
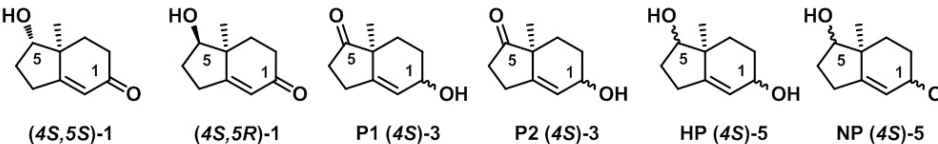
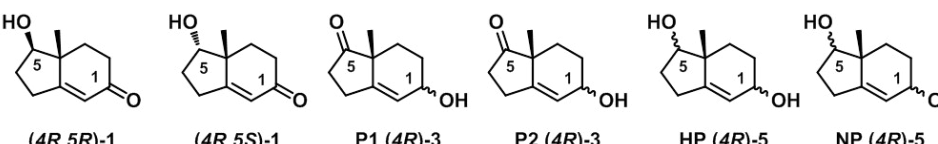


Abb. 6.7: Semiquantitative Auswertung der enzymatischen Bildung der Diketone durch At2g29350, CoTR und ausgesuchte Enzymvarianten ausgehend von den (4*S*,5*S*)- und (4*R*,5*R*)-Diastereomeren der α,β -ungesättigten Hydroxyketone. Ansatzbedingungen: 75 $\mu\text{g/mL}$ (blau) oder 150 $\mu\text{g/mL}$ (grün) Enzym, 1 mM Substrat, 3 mM NAD(P)⁺, pH-Optima der Enzyme (Ausnahme: At2g29350(V103A)), 3 h, 350 rpm, 30 °C. Extraktion mit Essigsäureethylester. Messung: GCMS, drei Wiederholungen mit drei technischen Replikaten (n = 3), Angabe der Mittelwerte der Peakflächen mit Standardabweichung.

6 Anhang

Tab. 6.18: Qualitative Produktbildung ausgehend vom (S)-Wieland-Miescher- (a), (R)-Wieland-Miescher- (b), (S)-Hajos-Parrish- (c) und (R)-Hajos-Parrish Keton (d). (+): Produkt konnte nachgewiesen werden, (-): Produkt konnte nicht nachgewiesen werden, (+*): Produkt konnte nachgewiesen werden, lag aber unterhalb des Quantifizierungslimits (LOQ: Signal:Rausch-Verhältnis von >5, Peakfläche von ≥40.000 und maximale prozentuale Standardabweichung von 12%). Ansatzbedingungen: 75 oder 150 µg/mL Enzym, 1 mM Substrat, 3 mM NAD(P)H, pH-Optima der Enzyme, 3 h, 350 rpm, 30 °C. Extraktion mit Essigsäureethylester. Messung: GCMS, drei Wiederholungen mit drei technischen Replikaten (n = 3).

<p>a)</p>  <p style="text-align: center;">a b c d e f</p>	<p>b)</p>  <p style="text-align: center;">a b c d e f</p>																																																																						
<p>c)</p>  <p style="text-align: center;">a b c d e f</p>	<p>d)</p>  <p style="text-align: center;">a b c d e f</p>																																																																						
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Enzym/Cosubstrat</th> <th>a</th> <th>b</th> <th>c</th> <th>d</th> <th>e</th> <th>f</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CoTR/NADPH</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> </tr> <tr> <td>CoTR(A206S)/NADPH</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">+*</td> <td style="text-align: center;">+*</td> </tr> <tr> <td>CoTR(S27A,A49D)/NADH</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">+*</td> </tr> <tr> <td>CoTR(S27A,A49D,A206S)/NADH</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+*</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+*</td> <td style="text-align: center;">+</td> </tr> </tbody> </table>	Enzym/Cosubstrat	a	b	c	d	e	f	CoTR/NADPH	+	-	-	-	-	-	CoTR(A206S)/NADPH	+	+	+	-	+*	+*	CoTR(S27A,A49D)/NADH	+	-	+	+	-	+*	CoTR(S27A,A49D,A206S)/NADH	+	+*	+	+	+*	+	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Enzym/Cosubstrat</th> <th>a</th> <th>b</th> <th>c</th> <th>d</th> <th>e</th> <th>f</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CoTR/NADPH</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> </tr> <tr> <td>CoTR(A206S)/NADPH</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> </tr> <tr> <td>CoTR(S27A,A49D)/NADH</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> </tr> <tr> <td>CoTR(S27A,A49D,A206S)/NADH</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> </tr> </tbody> </table>	Enzym/Cosubstrat	a	b	c	d	e	f	CoTR/NADPH	+	+	-	-	-	-	CoTR(A206S)/NADPH	+	+	-	-	-	-	CoTR(S27A,A49D)/NADH	+	+	-	-	-	-	CoTR(S27A,A49D,A206S)/NADH	+	+	-	-	+	-
Enzym/Cosubstrat	a	b	c	d	e	f																																																																	
CoTR/NADPH	+	-	-	-	-	-																																																																	
CoTR(A206S)/NADPH	+	+	+	-	+*	+*																																																																	
CoTR(S27A,A49D)/NADH	+	-	+	+	-	+*																																																																	
CoTR(S27A,A49D,A206S)/NADH	+	+*	+	+	+*	+																																																																	
Enzym/Cosubstrat	a	b	c	d	e	f																																																																	
CoTR/NADPH	+	+	-	-	-	-																																																																	
CoTR(A206S)/NADPH	+	+	-	-	-	-																																																																	
CoTR(S27A,A49D)/NADH	+	+	-	-	-	-																																																																	
CoTR(S27A,A49D,A206S)/NADH	+	+	-	-	+	-																																																																	
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Enzym/Cosubstrat</th> <th>a</th> <th>b</th> <th>c</th> <th>d</th> <th>e</th> <th>f</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CoTR/NADPH</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+*</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> </tr> <tr> <td>CoTR(A206S)/NADPH</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> </tr> <tr> <td>CoTR(S27A,A49D)/NADH</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+*</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> </tr> <tr> <td>CoTR(S27A,A49D,A206S)/NADH</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+*</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> </tr> </tbody> </table>	Enzym/Cosubstrat	a	b	c	d	e	f	CoTR/NADPH	+	+*	-	-	-	-	CoTR(A206S)/NADPH	+	+	-	-	-	-	CoTR(S27A,A49D)/NADH	+	+*	+	+	-	-	CoTR(S27A,A49D,A206S)/NADH	+	+*	+	+	-	-	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left;">Enzym/Cosubstrat</th> <th>a</th> <th>b</th> <th>c</th> <th>d</th> <th>e</th> <th>f</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>CoTR/NADPH</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> </tr> <tr> <td>CoTR(A206S)/NADPH</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> </tr> <tr> <td>CoTR(S27A,A49D)/NADH</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> </tr> <tr> <td>CoTR(S27A,A49D,A206S)/NADH</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">+</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> <td style="text-align: center;">-</td> </tr> </tbody> </table>	Enzym/Cosubstrat	a	b	c	d	e	f	CoTR/NADPH	+	+	-	-	-	-	CoTR(A206S)/NADPH	+	+	-	-	-	-	CoTR(S27A,A49D)/NADH	+	+	-	-	-	-	CoTR(S27A,A49D,A206S)/NADH	+	+	-	-	-	-
Enzym/Cosubstrat	a	b	c	d	e	f																																																																	
CoTR/NADPH	+	+*	-	-	-	-																																																																	
CoTR(A206S)/NADPH	+	+	-	-	-	-																																																																	
CoTR(S27A,A49D)/NADH	+	+*	+	+	-	-																																																																	
CoTR(S27A,A49D,A206S)/NADH	+	+*	+	+	-	-																																																																	
Enzym/Cosubstrat	a	b	c	d	e	f																																																																	
CoTR/NADPH	+	+	-	-	-	-																																																																	
CoTR(A206S)/NADPH	+	+	-	-	-	-																																																																	
CoTR(S27A,A49D)/NADH	+	+	-	-	-	-																																																																	
CoTR(S27A,A49D,A206S)/NADH	+	+	-	-	-	-																																																																	

6.3.5 Kurvenverläufe der kinetischen Charakterisierung

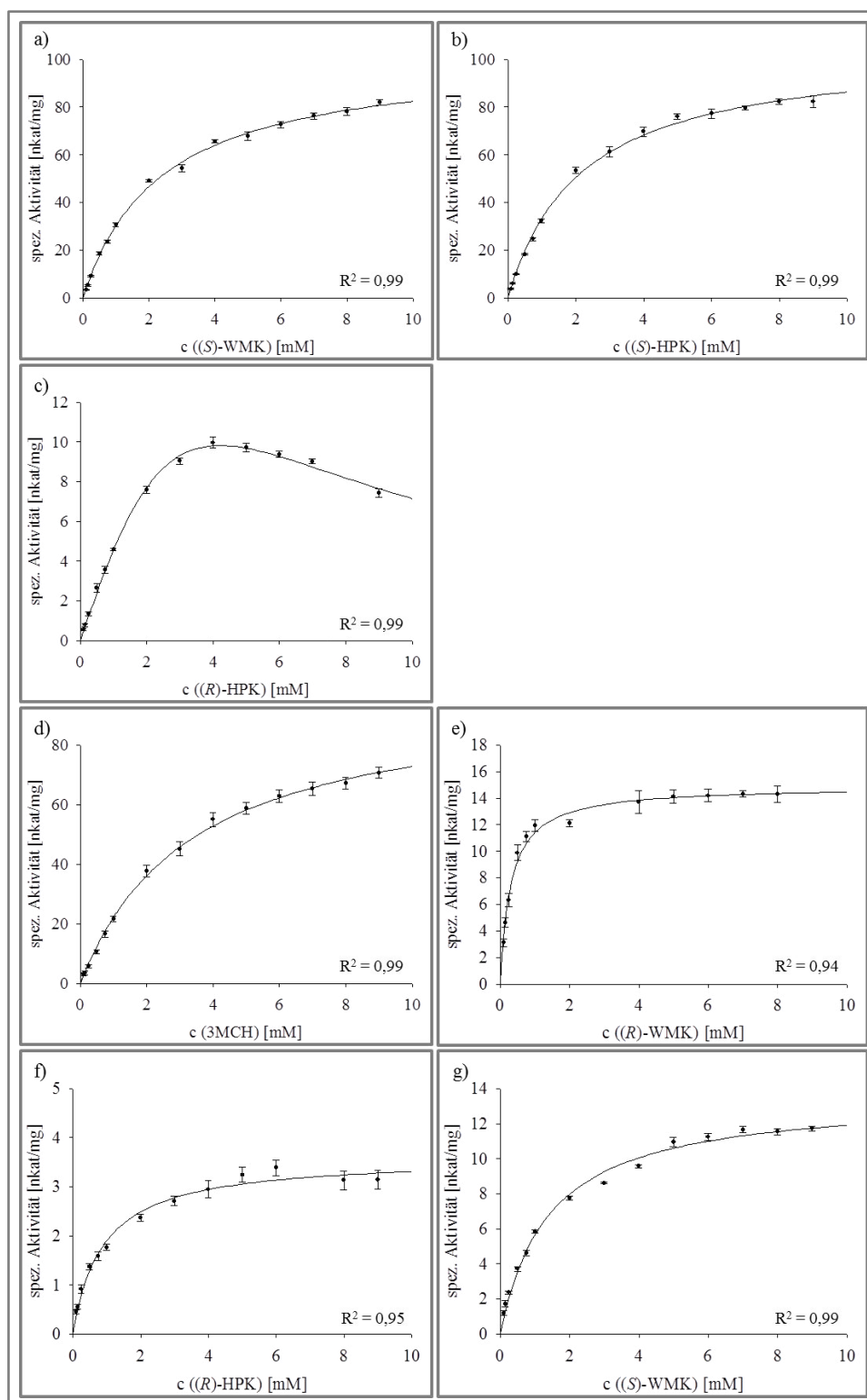


Abb. 6.8: Ermittlung der kinetischen Parameter für die katalysierten Umsetzungen durch At2g29350 und CoTR. Umsetzung durch At2g29350 von a) (S)-WMK (NADPH: 0,2 mM); b) (S)-HPK (NADPH: 0,2 mM); c) (R)-WMK (NADPH: 0,2 mM). Umsetzung durch CoTR von d) 3MCH (NADH: 0,6 mM); e) (R)-WMK (NADPH: 0,2 mM); f) (R)-HPK (NADPH: 0,2 mM); g) (S)-WMK (NADPH: 0,2 mM). Alle Kinetiken geplottet nach Michaelis und Menten (Ausnahme c): uncompetitive Substratinhibierung). Messung bei den pH-Optima, 30 °C. Photometrische Messung der Absorptionsänderung von NAD(P)H bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus vier Wiederholungen (Ausnahme d): drei mit vier technischen Replikaten (n = 4).

6 Anhang

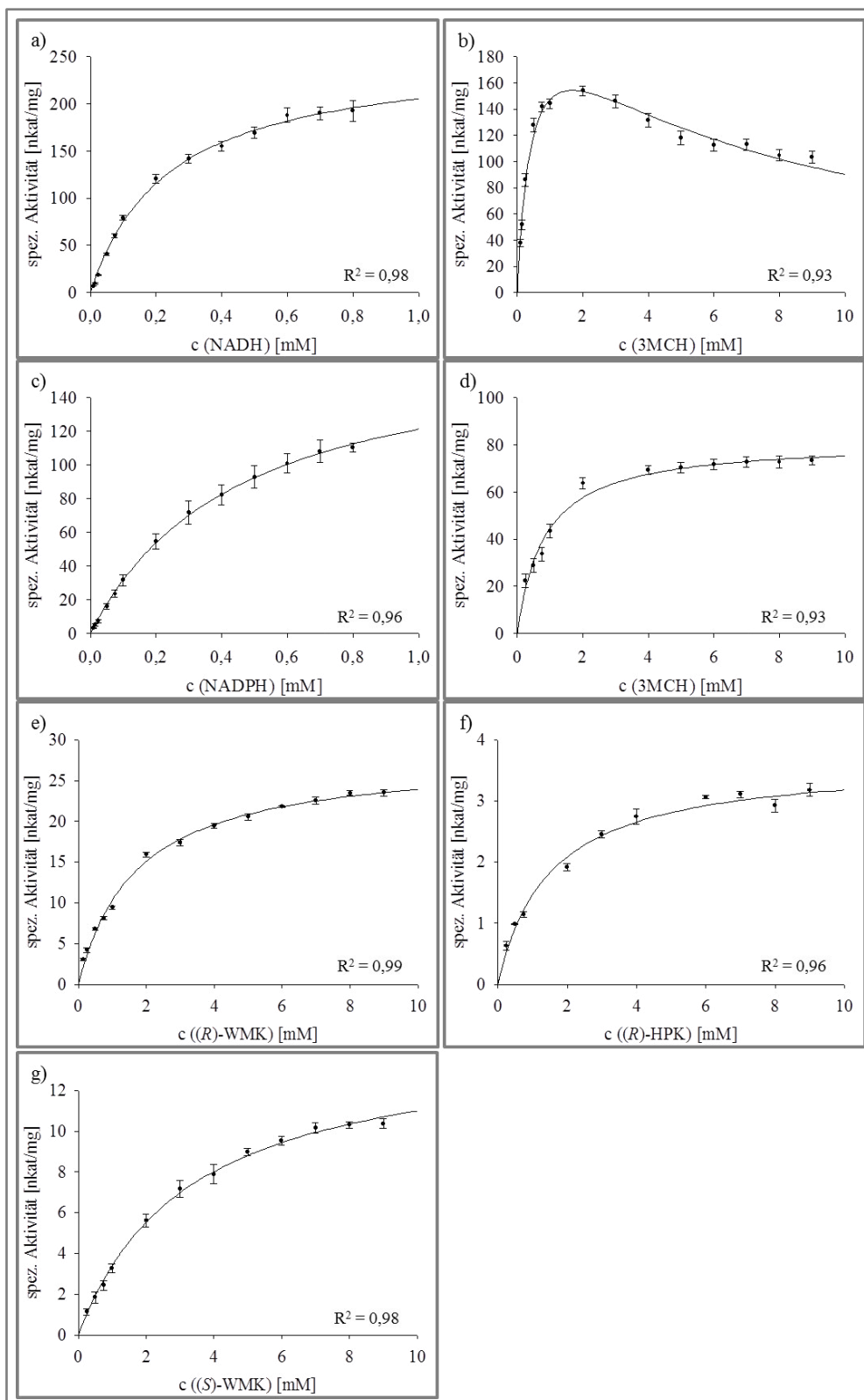


Abb. 6.9: Ermittlung der kinetischen Parameter für die katalysierten Umsetzungen durch CoTR(A49D). Umsetzung von a) NADH (3MCH: 2 mM); b) 3MCH (NADH: 0,7 mM); c) NADPH (3MCH: 5 mM); d) 3MCH (NADPH: 0,8 mM); e) ((R)-WMK (NADH: 0,7 mM); f) ((R)-HPK (NADH: 0,7 mM); g) ((S)-WMK (NADH: 0,7 mM). Alle Kinetiken geplottet nach Michaelis und Menten, Ausnahme b) geplottet entsprechend einer unkompetitiven Substratinhibition. Messung bei pH 5,0 (CPP), 30 °C. Photometrische Messung der Absorptionsänderung von NAD(P)H bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus vier Wiederholungen mit vier technischen Replikaten (n = 4).

6 Anhang

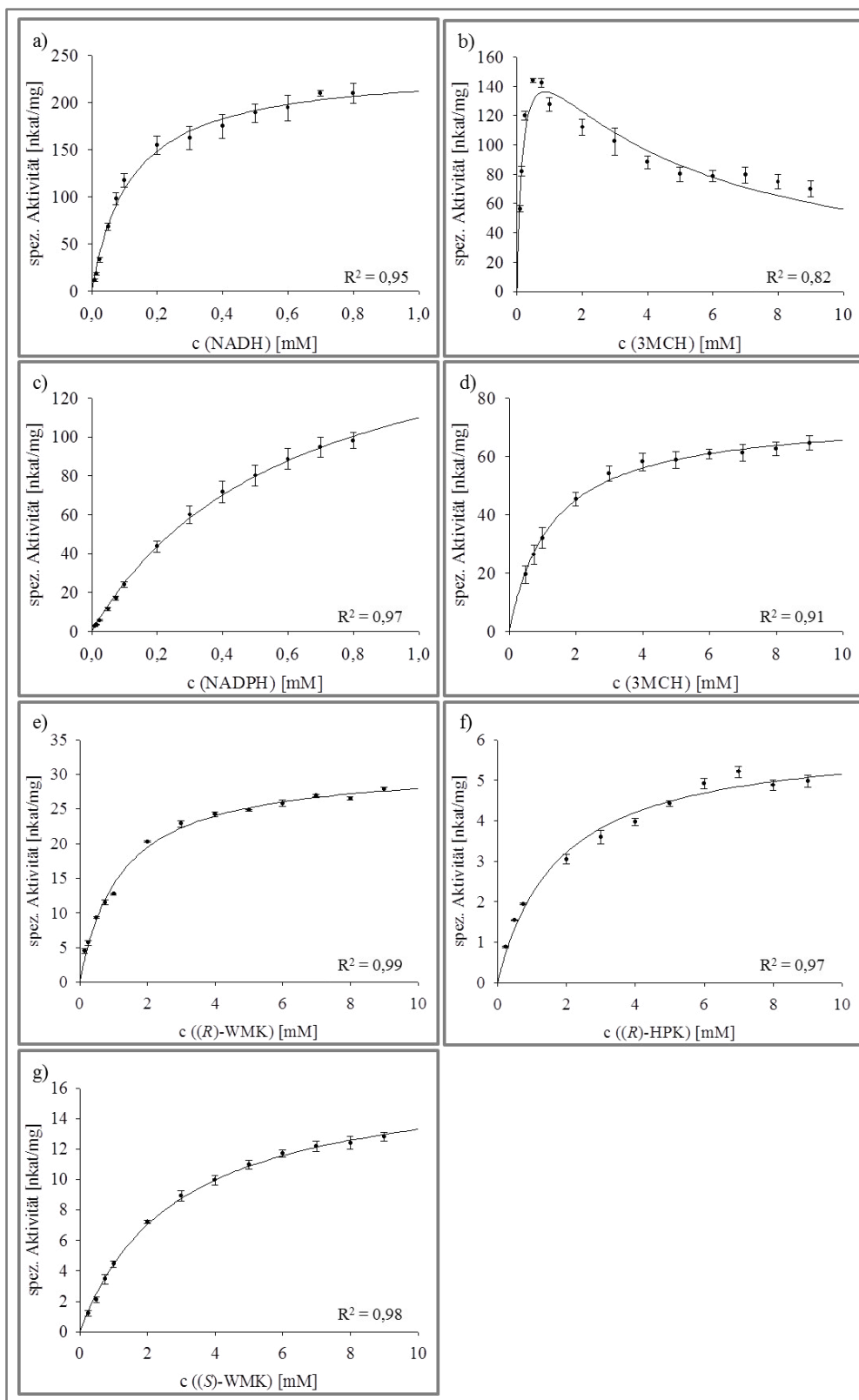


Abb. 6.10: Ermittlung der kinetischen Parameter für die katalysierten Umsetzungen durch CoTR(S27A,-A49D). Umsetzung von a) NADH (3MCH: 0,5 mM); b) 3MCH (NADH: 0,7 mM); c) NADPH (3MCH: 5 mM); d) 3MCH (NADPH: 0,8 mM); e) (R)-WMK (NADH: 0,7 mM); f) (R)-HPK (NADH: 0,7 mM); g) (S)-WMK (NADH: 0,7 mM). Alle Kinetiken geplottet nach Michaelis und Menten, Ausnahme b) geplottet entsprechend einer unkompetitiven Substratinhibition. Messung bei pH 5,0 (CPP), 30 °C. Photometrische Messung der Absorptionsänderung von NAD(P)H bei 340 nm. Mittelwert und Standardabweichung aus vier Wiederholungen mit vier technischen Replikaten (n = 4).

6.3.6 Sequenzalignement der relevanten Proteine

DsTRI	MEESKVSMMNCNNEGRWSLKGTTALVTGGSKGIGYAIVEELAGLGARVYTCSFNEKELDE	60
DsTRII	-----MAGRWNLEGTALVTGGSRGIGYGIVEELASLGASVYTCSFNQKELND	48
CoTR	MA---NLRESSRDKSRWSLEGMTALVTGGSKGIGEA VVEELAMLGARVHTCAFD ETQLQE	57
At2g29350	MA---KEGGLGENSRWSLGGMTALVTGGSKGIGEA VVEELAMLGAKVHTCAFD ETQLQE	56
At2g29360	MA---KTGESLRDKPRWSLVGMTALVTGGSKGIGEA VVEELATLGARIHTCAFD ETQLQE	57
At2g29330	-----MDKRWSLQGLTALVTGGASGIGHAIVEELAGFGAKIHVCPISK TLLNQ	48
	*** * *****: *** .:***** :** :.* .:. *::	
DsTRI	CLEIWREKGLNVEGSVCDLLSRTERDKLMQTVAHVFDGKLNILVNNAGVVIHKEAKDFTE	120
DsTRII	CLTQWRSKGFKVEASVCDLSSRSERQELMNTVANHFHGKLNILVNNAGIVIYKEAKDYTV	108
CoTR	SLREWQAKGFQVTTSVCDVSSRDQREKLMETVSSLFQGKLNILVNNAGTCITKPTIDYTS	117
At2g29350	RLREWQAKGFQVTTSVCDVSSRDQRVKLMETVSSLYQKLNILVNNVGTSTIFKPTTEYTA	116
At2g29360	SLRKWQAKGFQVTTSVCDVSSRDKREKLMETVSTIFEGKLNILVNNVGTCTIVKPTLQHTA	117
At2g29330	SLSEWEKKGQVSGSVCDASNRLERETLMQTVTTIFDGKLNILVNNVGTIRTKPTIEYEA	108
	* * . **:* * **** . * : * **:* : .***** * * : . .	
DsTRI	KDYNIMGTNFEAAYHLSQIAYPLLKASQNGNVIFLSSIAGFSALPSVSLYSASKGAINQ	180
DsTRII	EDYSLIMSINFEAAYHLSVLAHPFLKASERGNVVFISVSGALAVPYEAVYGATKGAMDQ	168
CoTR	EDFSFLMSTNLESSFHLSQLAHPLLKSSGLSIVLISVASVHVNVGSIYGATKGAMNQ	177
At2g29350	EDFSFVMATNLESASFHLSQLAHPLLKASGSGSIVLISVAGVHVNVGSIYGATKGAMNQ	176
At2g29360	EDFSFTMATNLESASFHLSQLAHPLLKASGSGSIVLISVSGVVHVNGASIVGSKGAMNQ	177
At2g29330	EDFSFLISTNLESAYHLSQLSHPLLKASNGIITFISVAGIVSFDAAASVGLTKGALNQ	168
	:*:. :. *:*:*** :*:***: * * : : ** . . :* . :***:*	
DsTRI	MTKSLACEWAKDNIRVNSVAPGVILTPLVETAIKKNPHQKEEDNFIVKTPMGRAGKPOE	240
DsTRII	LTRCLAFEWAKDNIRVNGVGPVIATSLVEMTIQ-DPEQENLNKLIIDRCALRRMGEPKE	227
CoTR	LARNLACEWASDSIKVNSVCPGFISTPLASNYFRNEEFK-----KEVENIIPTRVGEANE	233
At2g29350	LARNLACEWASDNIRTNSVCPWYITTPLSNDFD-DEEFK-----KEAVRTTPMGRVGEANE	231
At2g29360	LGRNLACEWASDNIRTNSVCPWFIEITPLVTELSNEEFK-----KEVESRPPMGRVGEVNE	233
At2g29330	LARNLACEWAKDGIRANAVAPNFITTALAKPFLEDAGFN-----EILSSRTPPLGRAGEPRE	224
	: : * * * * . * : . * * * * * * * : : . . * * : . *	
DsTRI	VSALIAFLCFPAASYITGQIIWADGGFTANGGF-----	273
DsTRII	LAAMVAFLCFPAASYVTGQIIYVDGGLMANCGF-----	260
CoTR	VSSLVAYLCLPAASYVTGQTICVDGGFVNGFTFKSLPLR	273
At2g29350	VSPLVAFCLCLPASASYITGQTICVDGGGATVNGFSFKTMP--	269
At2g29360	VSSLVAFCLCLPAASYITGQTICVDGGFTVNGFSFKPLP--	271
At2g29330	VASLVAFCLCLPAASYITGQTICVDGGLTVNGFSYQP----	260
	: : * * : * * : * * : * * * * * * * * . * * * . *	

Abb. 6.11: Multiples Sequenzalignement (EMBL-EBI/Clustal Omega) der Tropinonreduktasen I und II aus *D. stramonium* (DsTRI und DsTRII) mit der Tropinonreduktase aus *C. officinalis* (CoTR) und den Tropinonreduktase-ähnlichen SDR aus *A. thaliana* (At2g29350, At2g29360 und At2g29330). Grau: Glycinreiches Motiv der klassischen SDR; gelb: Motiv zur Stabilisierung des zentralen β -Faltblattes; grün: basische Aminosäuren für die NADP(H)-Bindung; pink: saure Aminosäure für die NAD(H)-Bindung; dunkelblau: konserviertes Aspartat zur Stabilisierung des Dinukleotid-Adenosins; hellblau: katalytische Tetrade; rot: Gap-Bereich in der substratbindenden C-terminalen Sequenzen von CoTR und der TRL im Vergleich zu TRI und TRII.

6.3.7 Homologiemodelle

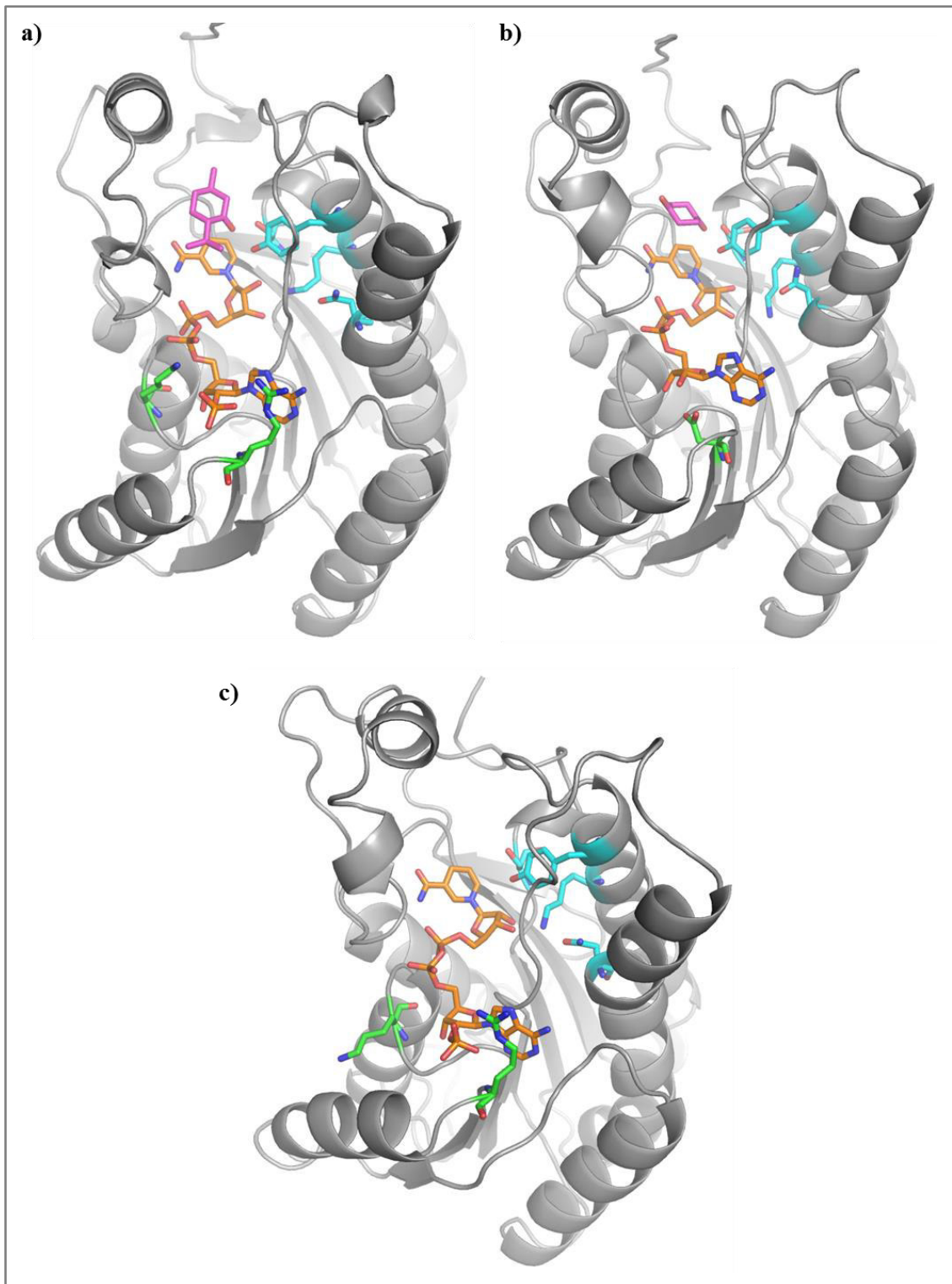


Abb. 6.12: Homologiemodelle von J. FISCHER (2015). Template Kristallstruktur von DsTRII (PDB-Code: 1IPF). a) At2g29350 mit NADPH (orange) und Menthon (pink), katalytische Tetrade (hellblau: S154, Y167, K171, N126), basische Aminosäuren für die Bindung von NADPH (grün: K27, R49); b) At2g29330 mit NADH (orange) und 1,4-Cyclohexadion (pink), katalytische Tetrade (hellblau: S146, Y159, K163, N118), saure Aminosäure für die Bindung von NADH (grün: D40); c) CoTR mit NADPH (orange), katalytische Tetrade (hellblau: S155, Y168, K172, N127), basische Aminosäuren für die Bindung von NADPH (grün: K28, R50).

6 Anhang

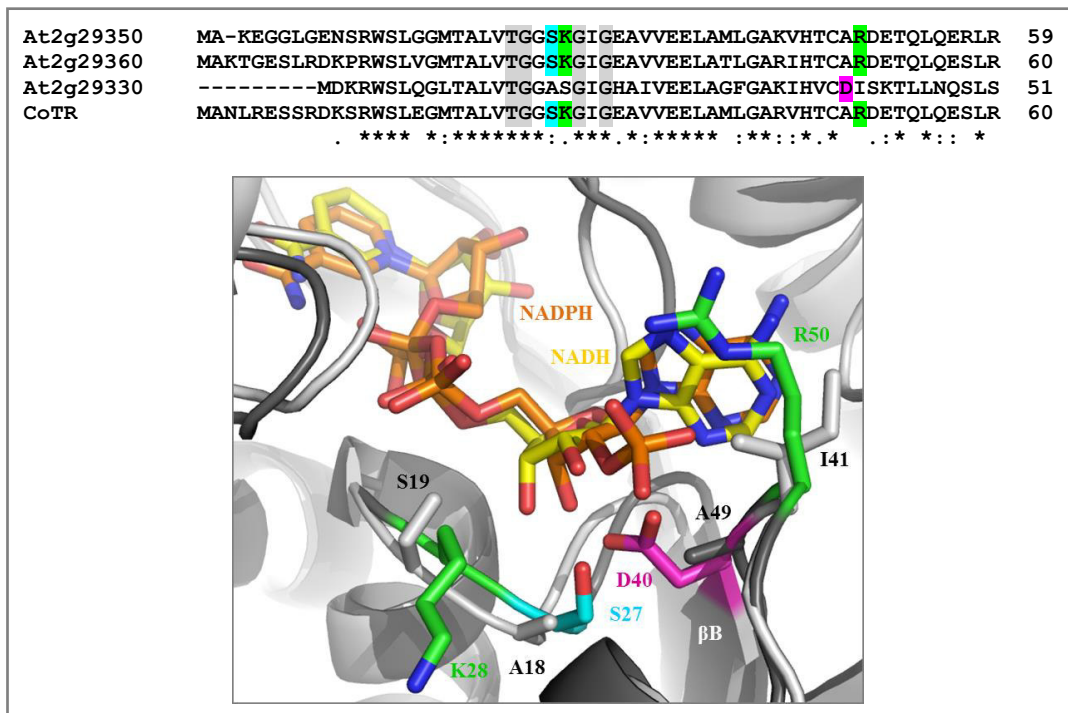


Abb. 6.13: Sequenz- und Strukturalignment der Cosubstratbinderegionen von CoTR und At2g29330. Zusätzlich N-terminale Sequenzen von At2g29350 und At2g29360. Dunkelgrau: CoTR; hellgrau: At2g29330; orange: NADPH; gelb: NADH. Relevante Aminosäuren werden als Sticks und für die Übersichtlichkeit ohne Hauptkette dargestellt; pink: saure Aminosäure am Ende des zweiten β -Faltblattes (β B) von At2g29330; hellblau: Serin im Glycin-reichen Motiv von CoTR; grün: basische Aminosäuren von CoTR im Glycin-reichen Motiv und nach dem zweiten β -Faltblatt (β B). Im Alignment grau: Glycin-reiches Motiv. Homologiemodelle, Fischer, 2015.

6.3.8 Kristallstruktur von CoTR

Tab. 6.19: Statistik der Datensammlung und der Strukturverfeinerung für die Kristallstrukturen A und B von CoTR. Datenwerte aus der Datenprozessierung für die äußere Auflösungsschale sind in Klammern angegeben.

	CoTR Kristallform A	CoTR Kristallform B
Datenprozessierung		
Strahlenquelle	Drehanode Rigaku MM007	Synchrotron BESSY BL14.1
Wellenlänge (Å)	1.5418	0.9184
Auflösungsbereich (Å)	29,1-1,77 (1,80-1,77)	46,7-1,44 (1,53-1,44)
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2	C2
a ; b ; c (Å)	118,0; 77,9; 116,3	74,6; 116,0; 118,1
α , β , γ (°)	90; 90; 90	90,0; 103,0; 90,0
R _{meas} (%)	7,8 (75,1)	7,6 (70,7)
Vollständigkeit (%)	92,4 (81,2)	98,2 (79,3)
Multiplizität	3,4 (1,1)	3,6
<I/ σ (I)>	11,0 (1,1)	12,1 (1,9)
Wilson B-Faktor (Å ²)	14,4	21,3
Strukturverfeinerung		
Anzahl Reflexe (<i>working set/test set</i>)	186418/9105	172196/2100
R _{work} (%) ^B	18,4	15,3
R _{free} (%) ^c	22,8	17,8
Anzahl Atome		
Protein	7707	7797
Kofaktor	192	192
Wasser	785	584
Mittlere B-Faktoren (Å ²)		
Protein	21,1	20,1
Kofaktor	18,6	18,1
Wasser		32,7
Abweichung von Idealwerten (RMSD)		
Bindungslängen (Å)	0,007	0,007
Bindungswinkel (°)	1,07	1,005
Ramachandran-Analyse (Molprobit)		
in bevorzugten Bereichen (%)	97,6	98,0
in noch erlaubten Bereichen (%)	2,2	2,0
in nicht-erlaubten Bereichen (%)	0,2	0,0

6 Anhang

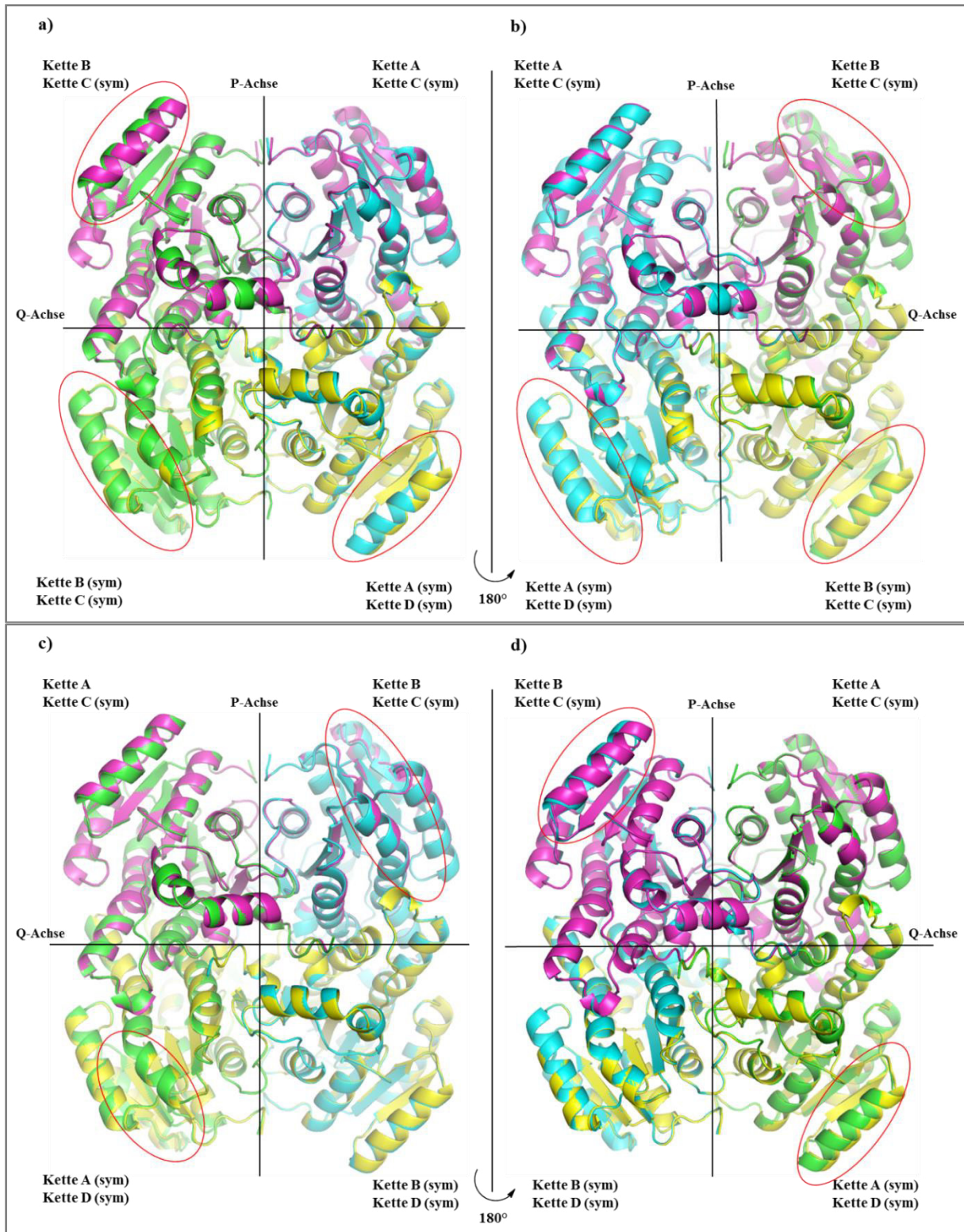


Abb. 6.14: Vergleich der Tetramere A/A/B/B und C/D/C/D der Kristallstrukturen A (a-b) und B (c-d). Grün: Kette A; hellblau: Kette B; pink: Kette C; gelb: Kette D. (sym) = Kette aus benachbarter asymmetrischer Einheit. Rot umrandet: Bereiche, die sich zwischen den Tetrameren unterscheidet.

6 Anhang

Tab. 6.20: Weitere Interaktionsflächen innerhalb und zwischen den asymmetrischen Einheiten, welche nicht an der Ausbildung der Quartärstruktur beteiligt sind (Kristallkontakte, KK). Analysiert mit PDBePISA/ EMBL-EBI. (sym) = Kette aus benachbarter asymmetrischer Einheit.

KK	Ketten	Aminosäuren	Bindungen	Fläche [Å^2]	
Kristallstruktur A					
1.	A B(sym)	Q63	R211	Polare Kontakte	80,8
2.	D A(sym)	Q94, S91, T88, V69, T71, E87	V69, T71, T88, Q94, S91, K84, Q63	Polare Kontakte, Salzbrücken	483,6
3.	C B	T88, T71, V69, Q63, T53, R60, E52, Q56, L92	T88, T71, V69, Q63, T53, R60, Q56, L92	Polare Kontakte	777,2
Kristallstruktur B					
1.	D A	R79	E213	Polare Kontakte, Salzbrücken	54,0
2.	C B	R211	G146, S190	Polare Kontakte	67,7
3.	C A	D114, E118	K216, K217	Polare Kontakte, Salzbrücken	99,4
4.	A B(sym)	R211	E52	Polare Kontakte, Salzbrücken	45,1
5.	D B(sym)	Q94, S91, K84, T88, Q63, V69	V69, T71, E87, T88, Q94, Q63	Polare Kontakte, Salzbrücken	495,4
6.	C A(sym)	T88, Q63, T53, R60, E52, Q56, V69, L92	E52, T53, Q63, V69, T88, L92, V73, T71, R60	Polare Kontakte	830,1

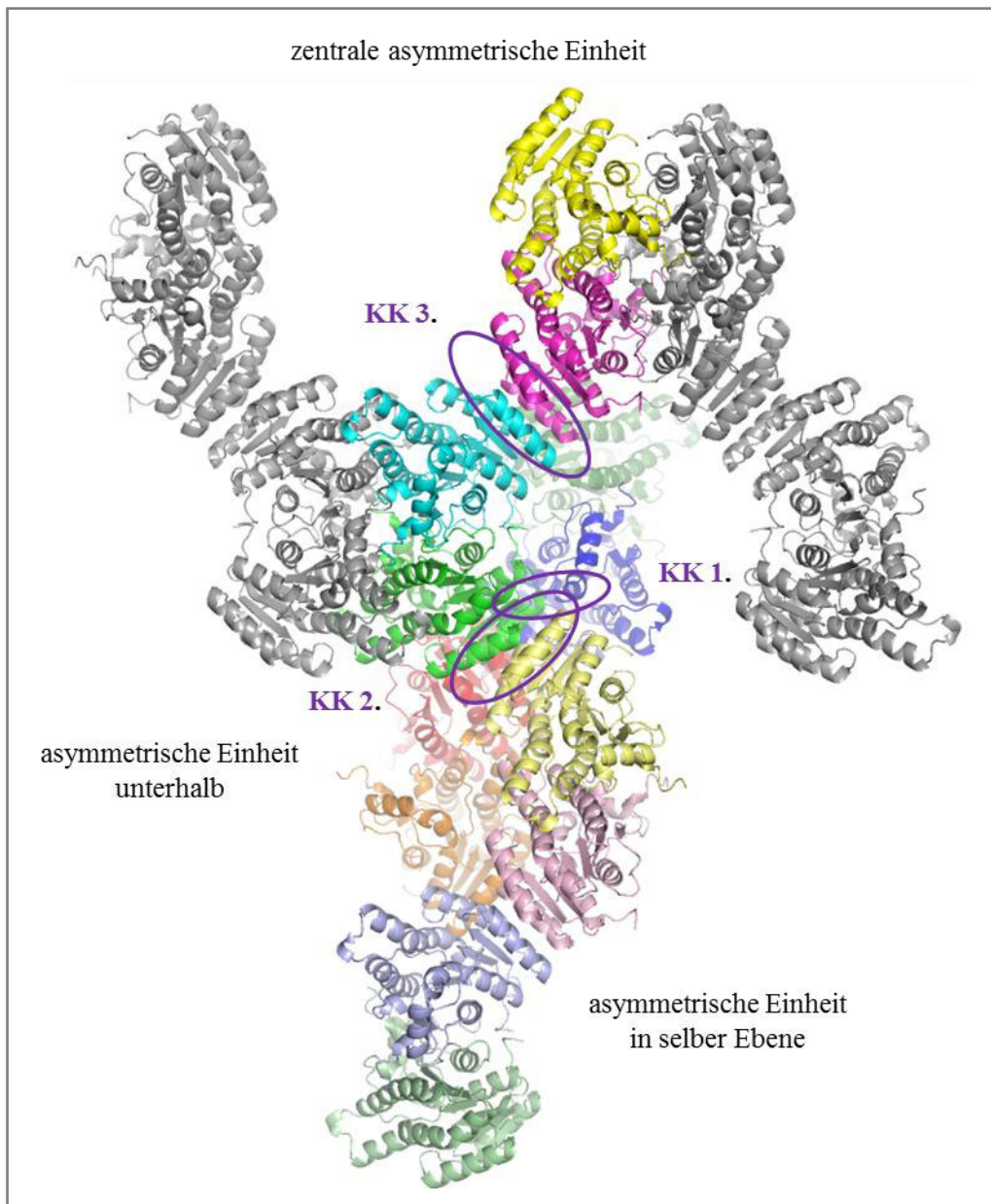


Abb. 6.15: Kristallkontakte KK 1. bis KK 3. (vergl. Tab. 6.20) in Kristallstruktur A. Dargestellt fünf benachbarte asymmetrische Einheiten. Zentrale asymmetrische Einheit (hellgrün: Kette A; hellblau: Kette B; pink: Kette C; gelb: Kette D) befindet sich auf einer Ebene mit den grau dargestellten asymmetrischen Einheiten, die an der Ausbildung der Tetramere beteiligt sind. Die weiteren asymmetrischen Einheiten tragen nicht zur Ausbildung der Quartärstruktur bei. Der Kontakt KK. 3. wird innerhalb der zentralen asymmetrischen Einheit gebildet. Zu der weiteren asymmetrischen Einheiten in derselben Ebene (pastellgrün: Kette A; pastellblau: Kette B; rosa: Kette C; pastellgelb: Kette D) bildet die zentrale asymmetrischen Einheit den Kontakt KK 2. und zu der unterhalb der Ebene liegenden asymmetrischen Einheit (dunkelgrün: Kette A; dunkelblau: Kette B; rot: Kette C; orange: Kette D) den Kontakt KK 1.

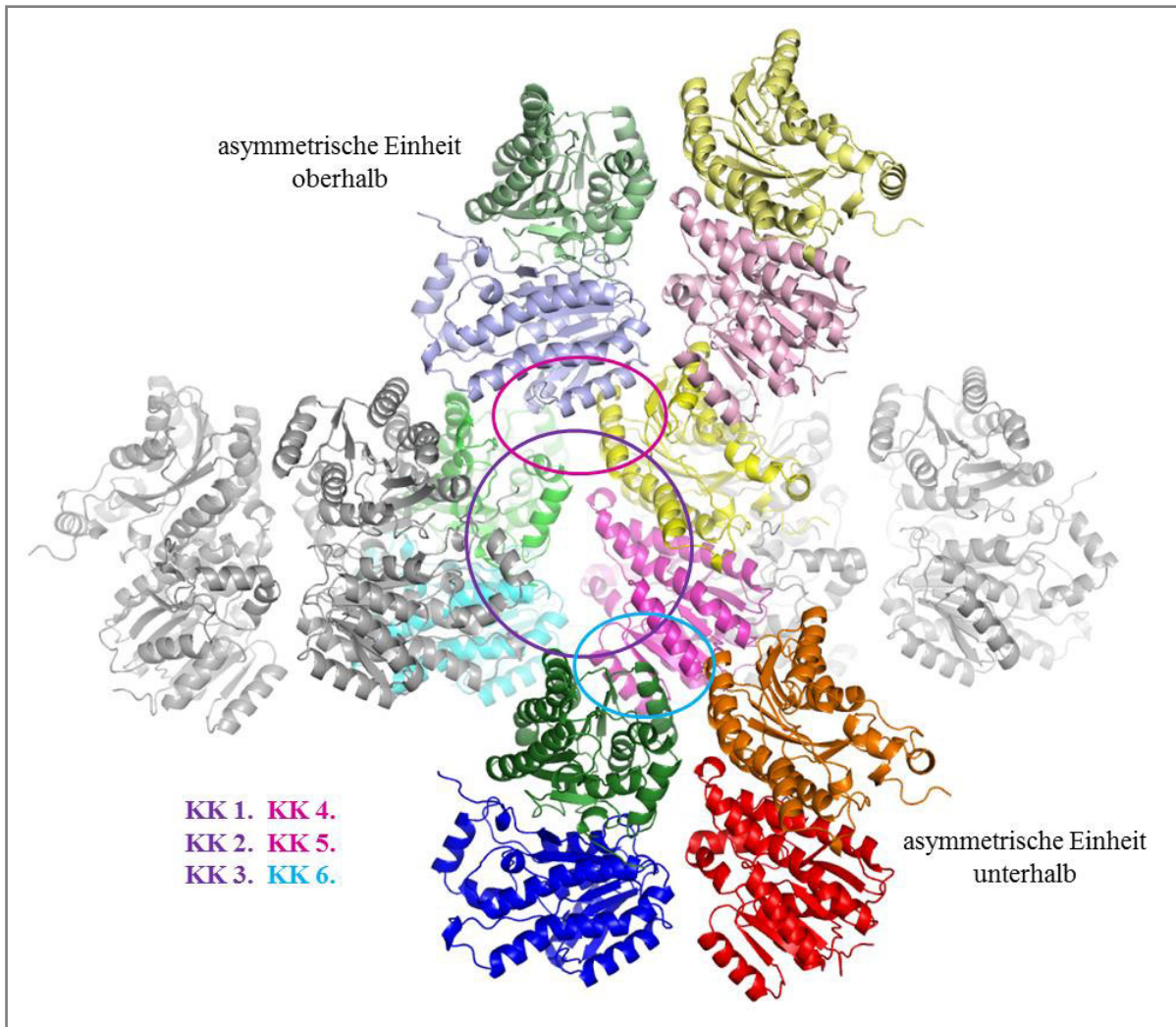


Abb. 6.16: Kristallkontakte KK 1. bis KK 6. (vergl. Tab. 6.20) in Kristallstruktur B. Dargestellt fünf benachbarte asymmetrische Einheiten. Zentrale asymmetrische Einheit (hellgrün: Kette A; hellblau: Kette B; pink: Kette C; gelb: Kette D) befindet sich auf einer Ebene mit den grau dargestellten asymmetrischen Einheiten, die an der Ausbildung der Tetramere beteiligt sind. Die asymmetrischen Einheiten über bzw. unter der zentralen asymmetrischen Einheit liegen nicht in derselben Ebene und tragen nicht zur Quartärstruktur bei. Die Kontakte KK 1. bis KK. 3 werden innerhalb der zentralen asymmetrischen Einheit gebildet. KK 4. und KK 5. werden von der zentralen asymmetrischen Einheit zu der darüberliegenden asymmetrischen Einheit (pastellgrün: Kette A; pastellblau: Kette B; rosa: Kette C; pastellgelb: Kette D) und KK 6. zu der darunterliegenden asymmetrischen Einheit (dunkelgrün: Kette A; dunkelblau: Kette B; rot: Kette C; orange: Kette D) gebildet.

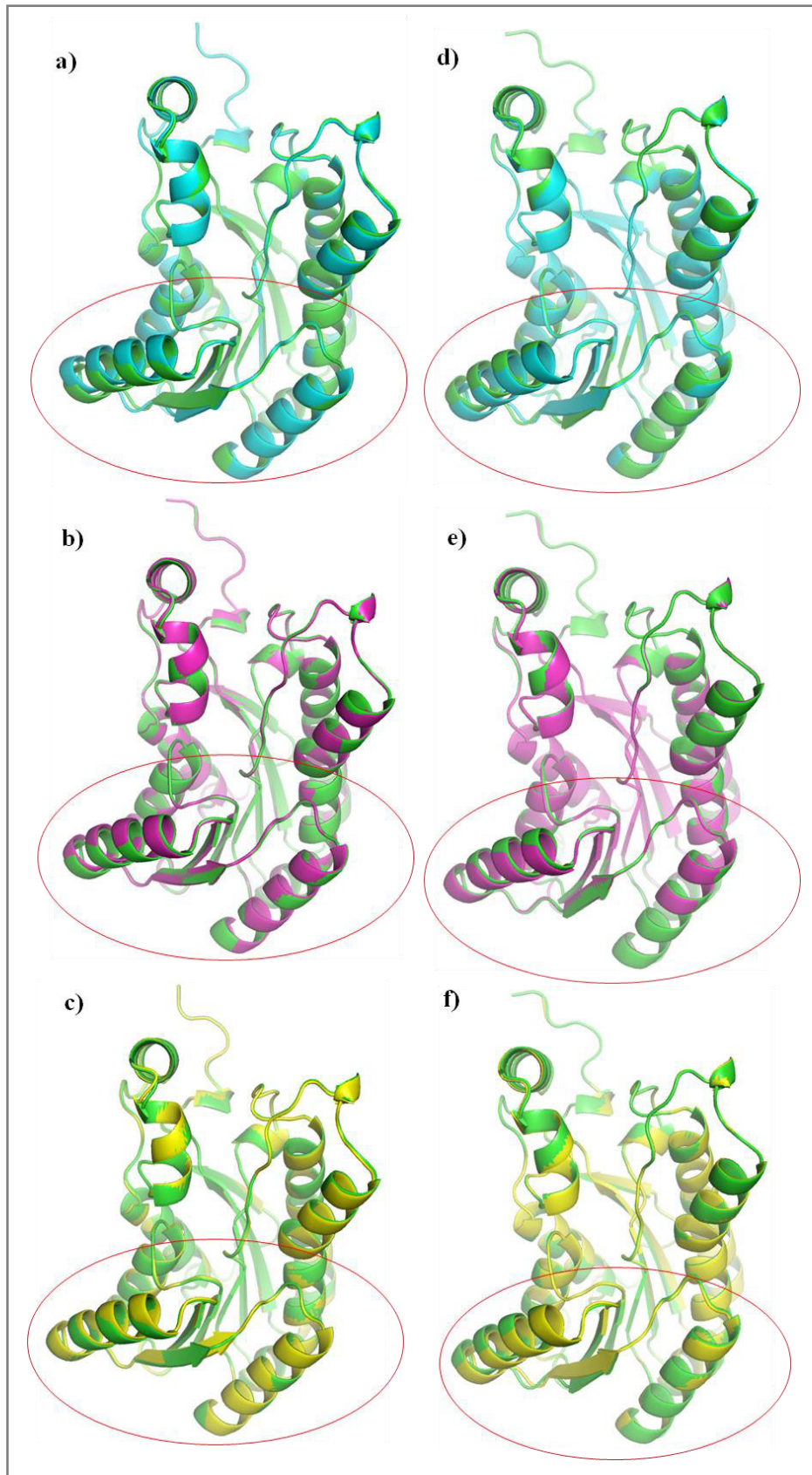


Abb. 6.17: Strukturalignment der Ketten A-D der Kristallstrukturen A und B. a-c) Struktur A: Ketten B-D auf Kette A; d-e) Struktur B: Ketten B-D auf Kette A. Grün: Kette A; hellblau: Kette B; pink: Kette C; gelb: Kette D. Rot umrandet: Bereich $\alpha C/\beta C/\alpha D$, der sich innerhalb der Monomere teilweise unterscheidet.

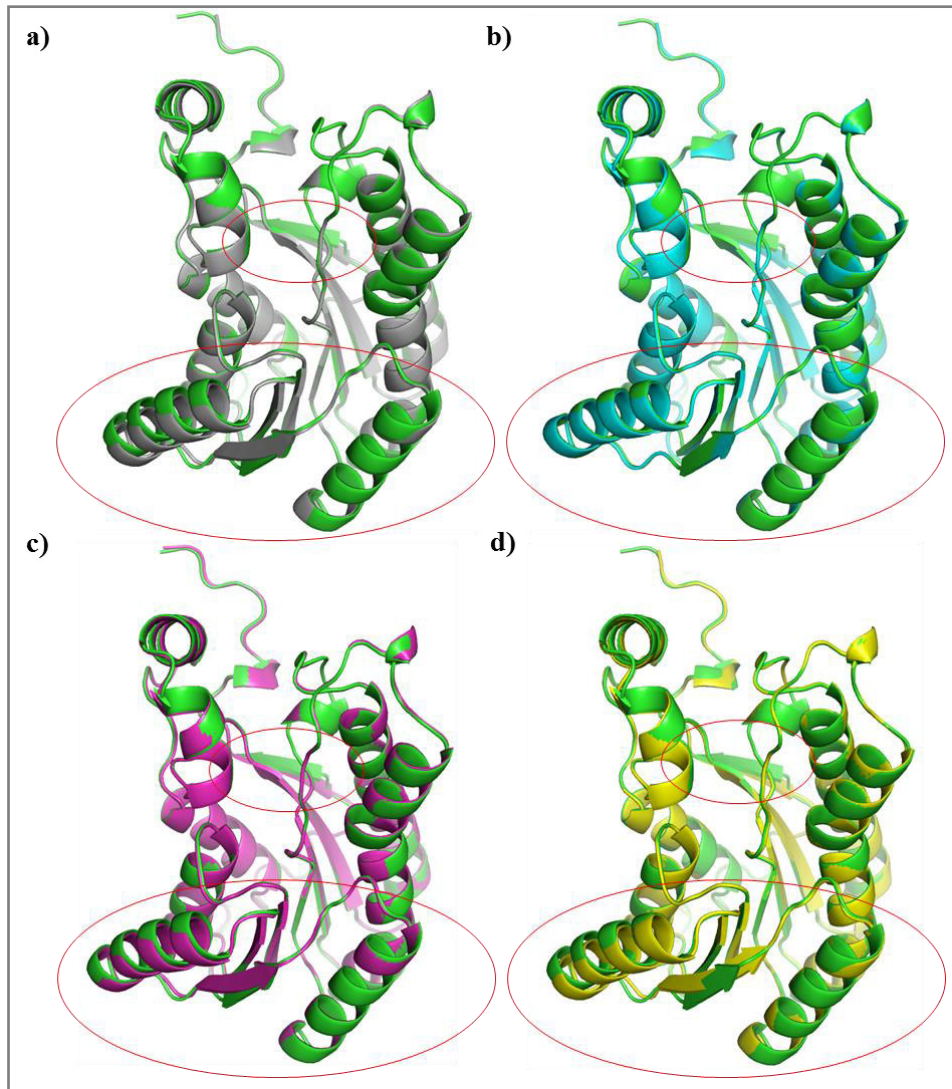


Abb. 6.18: Strukturalignment der Ketten A-D der Kristallstruktur A auf Kette A der Kristallstruktur B.
 Grün: Kette A (Struktur B); grau: Kette A (Struktur A); hellblau: Kette B; pink: Kette C; gelb: Kette D. Rot umrandet: Bereiche, die teilweise zwischen den Strukturen abweichen. Großer Kreis: Bereich $\alpha C/\beta C/\alpha D$; kleiner Kreis: βG , Unterschied im Bereich von Q252.

6 Anhang

Tab. 6.21: RMSD-Werte zwischen den Ketten A-D innerhalb und zwischen den beiden Kristallstrukturen A und B. Werte wurden mit Pymol ermittelt. Anzahl der Aminosäuren gibt an wie viele Aminosäuren nach drei Berechnungszyklen für den RMSD-Wert aufeinander abgebildet wurden.

Struktur 1/Kette	Struktur 2/Kette	RMSD-Wert	Anzahl der Aminosäuren
Struktur A/Kette B	Struktur A/Kette A	0,205	1727
Struktur A/Kette C	Struktur A/Kette A	0,185	1755
Struktur A/Kette D	Struktur A/Kette A	0,193	1725
Struktur A/Kette C	Struktur A/Kette B	0,176	1752
Struktur A/Kette D	Struktur A/Kette B	0,194	1792
Struktur A/Kette D	Struktur A/Kette C	0,202	1759
Struktur B/Kette B	Struktur B/Kette A	0,173	1721
Struktur B/Kette C	Struktur B/Kette A	0,134	1737
Struktur B/Kette D	Struktur B/Kette A	0,164	1763
Struktur B/Kette C	Struktur B/Kette B	0,152	1761
Struktur B/Kette D	Struktur B/Kette B	0,117	1728
Struktur B/Kette D	Struktur B/Kette C	0,172	1738
Struktur A/Kette A	Struktur B/Kette A	0,268	1695
Struktur A/Kette B	Struktur B/Kette A	0,182	1732
Struktur A/Kette C	Struktur B/Kette A	0,220	1738
Struktur A/Kette D	Struktur B/Kette A	0,230	1709
Struktur A/Kette A	Struktur B/Kette B	0,189	1747
Struktur A/Kette B	Struktur B/Kette B	0,214	1718
Struktur A/Kette C	Struktur B/Kette B	0,202	1733
Struktur A/Kette D	Struktur B/Kette B	0,185	1765
Struktur A/Kette A	Struktur B/Kette C	0,246	1700
Struktur A/Kette B	Struktur B/Kette C	0,183	1740
Struktur A/Kette C	Struktur B/Kette C	0,179	1748
Struktur A/Kette D	Struktur B/Kette C	0,250	1714
Struktur A/Kette A	Struktur B/Kette D	0,229	1738
Struktur A/Kette B	Struktur B/Kette D	0,214	1722
Struktur A/Kette C	Struktur B/Kette D	0,213	1726
Struktur A/Kette D	Struktur B/Kette D	0,160	1752

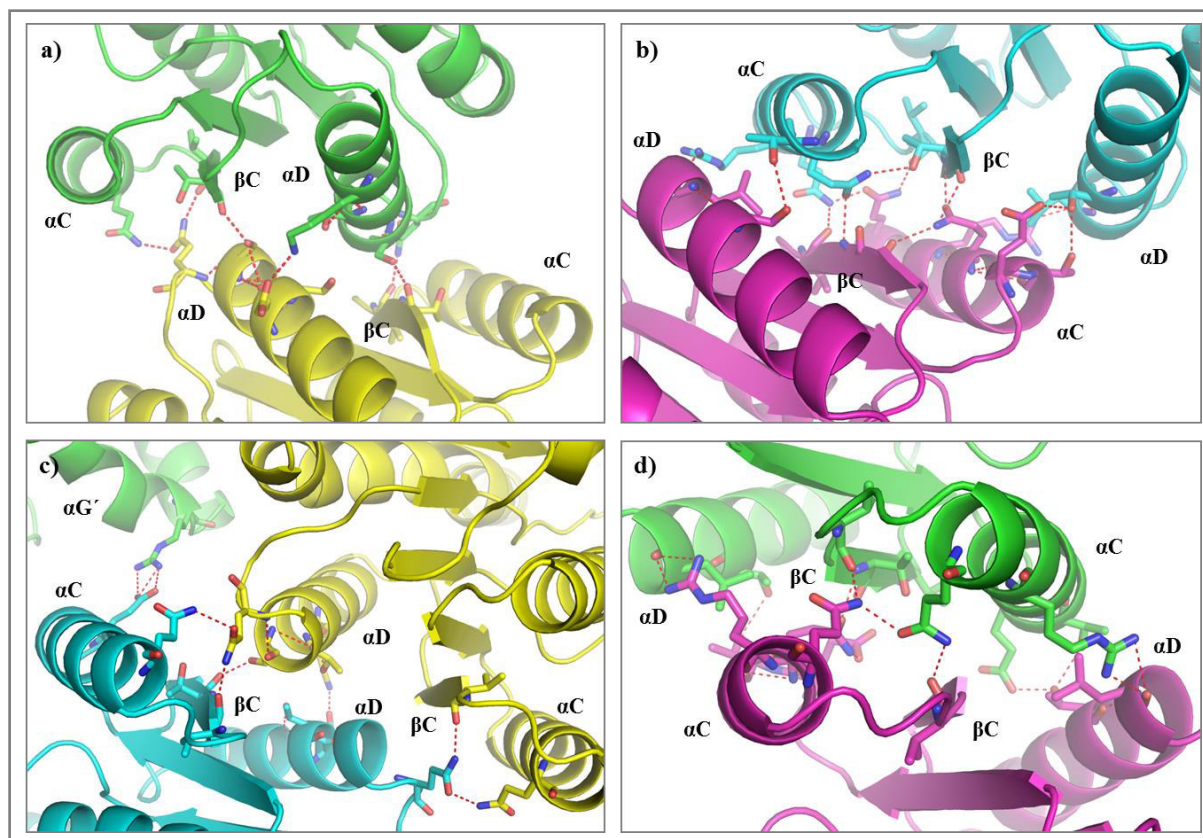


Abb. 6.19: Kristallkontakte (KK) in den Strukturen A und B. Struktur A: a) KK 2., b) KK 3.; Struktur B: c) KK 5., d) KK 6.. Der Bereich $\alpha C/\beta C/\alpha D$ der einen Kette interagiert mit dem entsprechenden Bereich der anderen Kette. Dabei sind die Wechselwirkungen verschieden ausgeprägt (vergl. Tab. 6.20). In c) ist zusätzlich KK 4. zwischen αC und $\alpha G'$ abgebildet. Grün: Kette A; hellblau: Kette B; pink: Kette C; gelb: Kette D. Rot gestrichelt: Wasserstoffbrücken.

6.4 Diskussion

Tab. 6.22: NADH-abhängige klassische SDR aus den Reichen der Pflanzen, Tiere und Bakterien.

Enzym	Abkürzung	Organismus	Literatur	Uniprot
Pflanzen				
Xanthoxin Dehydrogenase	ABA2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	González-Guzmán et al., 2002	Q9C826
(-)- <i>trans</i> -Isopiperitenol Dehydrogenase	ISPD	<i>Mentha piperita</i>	Ringer et al., 2005	Q5C9I9
Zerumbon -Synthase	ZSD1	<i>Zingiber zerumbet</i>	Okamoto et al., 2011	F1SWA0
Tiere				
17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 8	HSD17B8	<i>Homo sapiens</i>	PDB-Code: 2PD6 (Turnbull et al., 2007)	Q92506
17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 10	17 β HSD10 (17bHSD10)	<i>Homo sapiens</i>	Shafqat et al., 2003	Q99714

6 Anhang

Fortsetzung Tab. 6.22

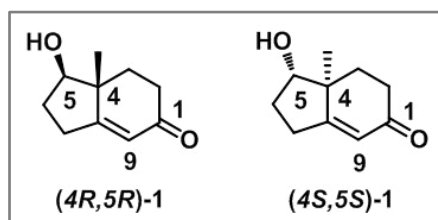
Enzym	Abkürzung	Organismus	Literatur	Uniprot
15-Hydroxyprostaglandin Dehydrogenase	15-PGDH	<i>Homo sapiens</i>	Ensor et al., 1991	P15428
R- β -Hydroxybutyrat Dehydrogenase	DHRS6	<i>Homo sapiens</i>	Guo et al., 2006	Q9BUT1
17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 8	Ke 6	<i>Mus musculus</i>	Fomitcheva et al., 1998	P50171
3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Typ2/ Amyloid- β bindende Alkoholdehydrogenase	rHADH II/ ABAD	<i>Rattus norvegicus</i>	Powell et al., 2000	O70351
Alkoholdehydrogenase	ADH	<i>Drosophila melanogaster</i>	Chen et al., 1990	P00334
Bakterien				
3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase	HSD 28	<i>Comamonas testosteroni</i>	Oppermann et al., 1996	P80702
3 β /17 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase	3 β /17 β -HSD (3b/17b-HSD)	<i>Comamonas testosteroni</i>	Filling et al., 2002	P19871
L-2,3-Butandiol Dehydrogenase	L-BDH	<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Takusagawa et al., 2001	Q9ZNN8
Carveol Dehydrogenase	CDH	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	van der Werf et al., 1999	Q9RA05
Sorbitol Dehydrogenase	SDH	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Schauder et al., 1995	Q59787
Galactitol 2-dehydrogenase	GatDH	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Carius et al., 2010	C0KTJ6
2,3-Butandiol Dehydrogenase	meso-BDH	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Otagiri et al., 2001	Q48436
3 α /20 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase	3 α /20 β -HSD (3a/20b-HSD)	<i>Streptomyces exfoliatus</i>	Ghosh et al., 1991	P19992
2-Dehydro-3-deoxy-D-gluconat 5-Dehydrogenase	KduD	<i>Escherichia coli</i>	Tubeleviciute et al., 2014	P37769
7 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase	7 β -HSDH (7b-HSDH)	<i>Escherichia coli</i>	Yoshimoto et al., 1991	P0AET8

6.5 Analytik der Referenzen

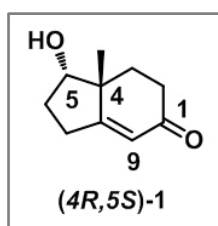
(*R/S*)-Hajos-Parrish-Keton:

$R_f = 0,46$ (100% EtOAc, UV/KMnO₄); $t_{ret} = 33,66$ min, **Hauptfragmente (EI):** 51, 65, 79, 94, 107, 122, 136, **164**.

Derivate ausgehend vom Hajos-Parrish-Keton:



$R_f = 0,30$ (100% EtOAc, UV/KMnO₄ sehr schwach); $t_{ret} = 42,66$ min, **Hauptfragmente (EI):** 53, 67, 79, 91, 109, 123, 138, **166**; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7,26 ppm) $\delta = 5,78$ (s, 1H, 9-H), 3,85 (dd, $J = 7.6, 10.3$ Hz, 1H, 5-H), 2,66-2,75 (m, 1H, 2-H/3-H/6-H/7-H), 2,35-2,57 (m, 3H, 2-H/3-H/6-H/7-H), 2,08-2,18 (m, 2H, 2-H/3-H/6-H/7-H), 1,74-1,87 (m, 2H, 2-H/3-H/6-H/7-H), 1,14 (s, 3H, 10-H) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm) $\delta = 199,3$ (s, 1-C), 175,1 (s, 8-C), 123,6 (d, 9-C), 80,8 (d, 5-C), 45,3 (s, 4-C), 34,3 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C), 33,4 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C), 29,3 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C), 26,6 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C), 15,2 (q, 10-C) ppm.



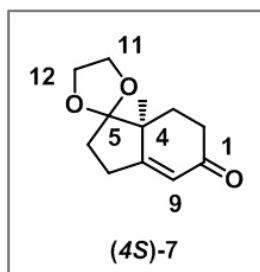
Daten von (*4R,5S*)-1 im Produktgemisch mit (*4R,5R*)-1 aus der Umsetzung von (*R*)-HPK mit CoTR (vergl. S. 85).

$R_f = 0,30$ (100% EtOAc, UV/KMnO₄ sehr schwach); $t_{ret} = 43,10$ min, **Hauptfragmente (EI):** 53, 67, 79, 91, 109, 123, 138, **166**; ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7,26 ppm) $\delta = 5,90$ (s, 1H, 9-H), 3,98 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, 5-H), 2,66-2,75* (m, 2H, 2-H/3-H/6-H/7-H), 2,35-2,57* (m, 3H, 2-H/3-H/6-H/7-H), 2,22-2,33 (m, 1H, 2-H/3-H/6-H/7-H), 1,74-1,87* (m, 2H, 2-H/3-H/6-H/7-H), 1,13 (s, 3H, 10-H) ppm; ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm) $\delta = 199,4$ (s, 1-C), 176,4 (s, 8-C), 123,5 (d, 9-C), 79,7 (d, 5-C), 48,0 (s, 4-C), 33,2 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C), 31,4 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C), 28,3 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C), 28,1 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C), 21,6

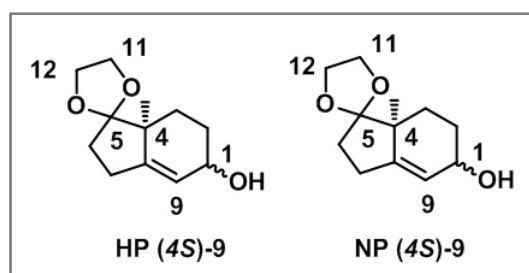
6 Anhang

(q, 10-C) ppm. (*) Überlagerter ppm-Bereich der CH₂-Gruppen von (4*R*,5*S*)-1 mit (4*R*,5*R*)-1, Werte konnten nicht abgegrenzt werden.

Für Produktgemisch: **HRMS** (ESI): berechnet für C₁₀H₁₅O₂⁺: 167,1067 [M + H]⁺, gefunden 167,1066 [M + H]⁺.



R_f = 0,48 (100% EtOAc, UV/KMnO₄); **t_{ret}** = 46,50 min, **Hauptfragmente (EI)**: 53, 65, 79, 86, 93, 99, 107, 121, 138, 151, 165, **208**; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7,26 ppm) δ = 5,81 (s, 1H, 9-H), 3,89-4,00 (m, 4H, 11-H, 12-H), 2,14-2,73 (m, 6H, 2-H/3-H/6-H/7-H), 1,89-1,95 (m, 1H, 2-H/3-H/6-H/7-H), 1,59-1,64 (m, 1H, 2-H/3-H/6-H/7-H), 1,27 (s, 3H, 10-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm) δ = 199,0 (s, 1-C), 174,3 (s, 5-C), 123,3 (d, 9-C), 117,6 (s, 8-C), 65,9 (t, 11-C/12-C), 65,0 (t, 11-C/12-C), 47,8 (s, 4-C), 33,2 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C), 31,8 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C), 26,9 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C), 26,6 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C), 20,2 (q, 10-C) ppm; **HRMS** (ESI): berechnet für C₁₂H₁₇O₃⁺: 209,1172 [M + H]⁺, gefunden 209,1172 [M + H]⁺.



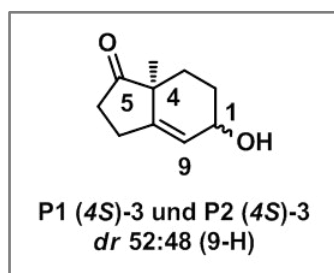
Hauptprodukt (4*S*)-9:

R_f = 0,42 (100% EtOAc, KMnO₄); **t_{ret}** = 44,65 min, **Hauptfragmente (EI)**: 55, 65, 73, 77, 86, 91, 105, 120, 133, 154, 177, 192, **210**; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7,26 ppm) δ = 5,41-5,44 (m, 1H, 9-H), 4,30-4,34 (m, 1H, 1-H), 3,84-3,96 (m, 4H, 11-H, 12-H), 2,44-2,53 (m, 1H, 7a-H), 2,21-2,31 (m, 1H, 7b-H), 2,03-3,12 (m, 2H, 2a-H, 6a-H), 1,79-1,91 (m, 2H, 6b-H, 3a-H), 1,51-1,61 (m, 1H, 2b-H), 1,33-1,38 (m, 1H, 3b-H) 1,16 (s, 3H, 10-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm) δ = 148,3 (s, 5-C), 123,0 (d, 9-C), 118,1 (s, 8-C), 68,5 (d, 1-C), 65,7 (t, 11-C/12-C), 64,8 (t, 11-C/12-C), 46,6 (s, 4-C), 32,1 (t, 7-C), 29,7 (t,

2-C), 26,8 (t, 3-C), 25,4 (t, 6-C), 21,8 (q, 10-C) ppm; **HRMS** (ESI): berechnet für $C_{12}H_{19}O_3^+$: 211,1329 $[M + H]^+$, gefunden 211,1326 $[M + H]^+$.

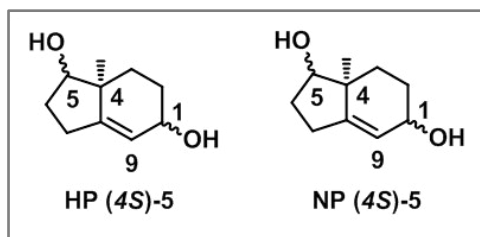
Nebenprodukt (4S)-9:

$R_f = 0,34$ (100% EtOAc, $KMnO_4$ sehr schwach); $t_{ret} = 43,90$ min, **Hauptfragmente (EI)**: 55, 65, 73, 77, 86, 91, 105, 120, 131, 154, 177, 192, **210**; **1H -NMR** (400 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3 = 7,26$ ppm) $\delta = 5,54$ -5,58 (m, 1H, 9-H), 4,06-4,12 (m, 1H, 1-H), 3,88-3,98 (m, 4H, 11-H, 12-H), 1,07 (s, 3H, 10-H) ppm; **^{13}C -NMR** (100 MHz, $CDCl_3$, $CDCl_3 = 77,16$ ppm) $\delta = 121,0$ (s, 9-C), 65,7 (t, 11-C/12-C), 64,9 (t, 11-C/12-C), 64,1 (q, 10-H) ppm. Die NMR-Daten können nicht vollständig angegeben werden, da das Produkt in einem Verhältnis von 1:1,9 mit dem Produkt HP (4S)-5 vorliegt und die NMR-Spektren zudem undefinierte Nebenprodukte im Bereich der CH_2 -Gruppen aufweisen. **HRMS** (ESI): berechnet für $C_{12}H_{19}O_3^+$: 211,1329 $[M + H]^+$, gefunden 211,1327 $[M + H]^+$.



Produktgemisch P1 (4S)-3 und P2 (4S)-3:

$R_f = 0,39$ (100% EtOAc, $KMnO_4$); t_{ret} (**P1**) = 29,68 min, **Hauptfragmente (EI)**: 53, 67, 79, 91, 105, 110, 123, 148, **166**; t_{ret} (**P2**) = 29,40 min, **Hauptfragmente (EI)**: 53, 67, 79, 91, 105, 110, 123, 148, **166**; **1H -NMR** (400 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3 = 7,26$ ppm) $\delta = 5,71$ (s, 1H, 9-H (P1)), 5,61 (s, 1H, 9-H (P2)), 4,26-4,31 (m, 1H, 1-H (P2)), 4,19-4,24 (m, 1H, 1-H (P1)), 2,66-2,78 (m, 2H, 7a-H (P1, P2)), 2,48-2,62 (m, 4H, 6a-H (P1, P2), 7b-H (P1, P2)), 2,19-2,33 (m, 2H, 6b-H (P1, P2)), 2,09-2,15 (m, 1H, 2a-H (P2)), 1,78-1,94 (m, 3H, 2a-H (P1), 3a,b-H (P2)), 1,44-1,69 (m, 4H, 2b-H (P1, P2), 3a,b-H (P1)), 1,19 (s, 3H, 10-H (P2)), 1,10 (s, 3H, 10-H (P1)) ppm; **^{13}C -NMR** (100 MHz, $CDCl_3$, $CDCl_3 = 77,16$ ppm) $\delta = 219,5$ (s, 5-C (P2)), 219,3 (s, 5-C (P1)), 146,8 (s, 8-C (P2)), 145,9 (s, 8-C (P1)), 124,3 (d, 9-C (P2)), 122,3 (d, 9-C (P1)), 68,1 (d, 1-C (P2)), 63,7 (d, 1-C (P1)), 48,2 (s, 4-C (P2)), 48,1 (s, 4-C (P1)), 36,8 (t, 6-C (P1)), 36,6 (t, 6-C (P2)), 29,5 (t, 2-C (P2)), 29,0 (t, 2-C (P1)), 27,6 (t, 3-C (P2)), 26,9 (t, 7-C (P2)), 26,6 (t, 7-C (P1)), 23,8 (t, 3-C (P1)), 21,9 (q, 10-C (P2)), 20,8 (q, 10-C (P1)) ppm; **HRMS** (ESI): berechnet für $C_{10}H_{15}O_2^+$: 167,1067 $[M + H]^+$, gefunden 167,1066 $[M + H]^+$.

**Hauptprodukt (4S)-5:**

$R_f = 0,34$ (100% EtOAc, KMnO_4); $t_{\text{ret}} = 35,04$ min, **Hauptfragmente (EI):** 55, 67, 79, 91, 109, 117, 135, 150, **168**; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7,26$ ppm) $\delta = 5,36\text{-}5,39$ (m, 1H, 9-H), 4,23-4,30 (m, 1H, 1-H), 3,63 (dd, $J = 7,8, 9,9$ Hz, 1H, 5-H), 2,43-2,52 (m, 1H, 3a-H), 2,11-2,18 (m, 1H, 3b-H), 2,01-2,09 (m, 2H, 2a-H, 6a-H), 1,80 (dt, $J = 3,5, 12,9$ Hz, 1H, 7a-H), 1,53-1,78 (m, 2H, 2b-H, 6b-H), 1,30-1,38 (m, 1H, 7b-H), 1,02 (s, 3H, 10-H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77,16$ ppm) $\delta = 148,8$ (s, 8-C), 123,3 (d, 9-C), 81,6 (d, 5-C), 68,7 (d, 1-C), 43,9 (s, 4-C), 34,0 (t, 7-C), 29,7 (t, 2-C/6-C), 29,4 (t, 2-C/6-C), 25,6 (t, 3-C), 16,6 (q, 10-C) ppm; **HRMS** (ESI): berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_2^+$: 169,1223 $[\text{M} + \text{H}]^+$, gefunden 169,1223 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

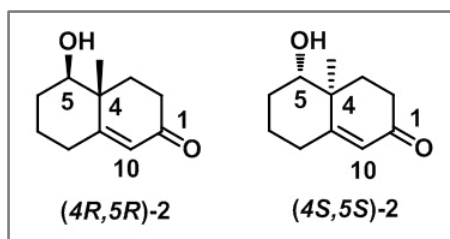
Nebenprodukt (4S)-5:

$R_f = 0,24$ (100% EtOAc, KMnO_4); $t_{\text{ret}} = 33,98$ min, **Hauptfragmente (EI):** 55, 65, 79, 91, 106, 121, 135, 150; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3 , $\text{CHCl}_3 = 7,26$ ppm) $\delta = 5,49\text{-}5,53$ (m, 1H, 9-H), 4,13-4,18 (m, 1H, 1-H), 3,69-3,73 (m, 1H, 5-H), 0,93 (s, 3H, 10-H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3 , $\text{CDCl}_3 = 77,16$ ppm) $\delta = 150,0$ (s, 8-C), 121,3 (d, 9-C), 81,9 (d, 5-C), 64,1 (d, 1-C), 43,8 (s, 4-C), 15,4 (q, 10-C) ppm. Die NMR-Daten können nicht vollständig angegeben werden, da die NMR-Spektren undefinierte Nebenprodukte aufweisen, welche den Bereich der CH_2 -Gruppen überlagern. **HRMS** (ESI): berechnet für $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{O}_2^+$: 169,1223 $[\text{M} + \text{H}]^+$, gefunden 169,1221 $[\text{M} + \text{H}]^+$.

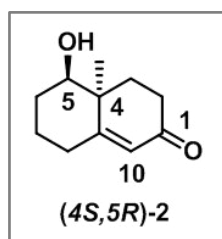
(R/S)-Wieland-Miescher-Keton:

$R_f = 0,47$ (100% EtOAc, UV/ KMnO_4); $t_{\text{ret}} = 16,77$ min, **Hauptfragmente (EI):** 55, 65, 79, 93, 108, 121, 136, 150, 160, **178**.

Derivate ausgehend vom Wieland-Miescher Keton:



$R_f = 0,35$ (100% EtOAc, UV/KMnO₄); $t_{ret} = 20,45$ min, **Hauptfragmente (EI):** 55, 67, 79, 91, 109, 124, 137, 147, **180**; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7,26 ppm) $\delta = 5,79$ (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, 10-H), 3,44 (dd, $J = 4.3, 11.6$ Hz, 1H, 5-H), 2,37-2,45 (m, 2H, 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 2,30-2,36 (m, 1H, 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 2,16-2,24 (m, 2H, 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 1,81-1,93 (m, 3H, 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 1,66-1,76 (m, 1H, 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 1,36-1,48 (m, 1H, 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 1,20 (s, 3H, 11-H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm) $\delta = 199,6$ (s, 1-C), 168,3 (s, 9-C), 125,7 (d, 10-C), 78,5 (d, 5-C), 41,7 (s, 4-C), 34,4 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C), 33,9 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C), 32,2 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C), 30,5 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C), 23,3 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C), 15,4 (q, 11-C) ppm.

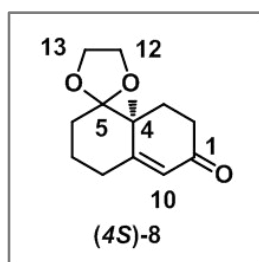


Daten von (4*S*,5*R*)-2 im Produktgemisch mit (4*S*,5*S*)-2 und (1*S*,4*S*,5*S*)-6 aus der Umsetzung von (*S*)-WMK mit CoTR (vergl. S. 85).

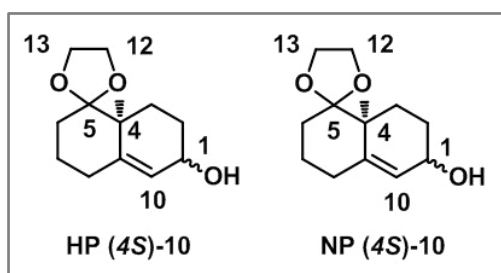
$R_f = 0,35$ (100% EtOAc, UV/KMnO₄); $t_{ret} = 20,98$ min, **Hauptfragmente (EI):** 55, 67, 79, 91, 109, 124, 137, 147, **180**; $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7,26 ppm) $\delta = 5,87$ (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, 10-H), 3,64-3,66 (m, 1H, 5-H), 1,20 (s, 3H, 11-H) ppm; $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm) $\delta = 199,5$ (s, 1-C), 167,6 (s, 9-C), 127,2 (d, 10-C), 75,5 (d, 5-C), 41,1 (s, 4-C), 15,4 (q, 11-C) ppm. Durch die Überlagerung im ppm-Bereich der CH₂-Gruppen von (4*S*,5*R*)-2 mit (4*S*,5*S*)-1 und (1*S*,4*S*,5*S*)-6 können keine eindeutigen Werte für die Signale der Wasserstoff- und Kohlenstoffatome angegeben werden.

Für Produktgemisch: **HRMS** (ESI): berechnet für C₁₁H₁₇O₂⁺: 181,1223 [M + H]⁺, gefunden 181,1224 [M + H]⁺.

6 Anhang



$R_f = 0,50$ (100% EtOAc, UV/KMnO₄); $t_{ret} = 26,29$ min, **Hauptfragmente (EI):** 55, 65, 79, 91, 99, 113, **222**; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7,26 ppm) $\delta = 5,81$ (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, 10-H), 3,92-4,01 (m, 4H, 12-H, 13-H), 2,25-2,47 (m, 5H, 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 1,62-1,93 (m, 5H, 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 1,35 (s, 3H, 11-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm) $\delta = 199,4$ (s, 1-C), 167,8 (s, 5-C), 125,8 (d, 10-C), 112,5 (s, 9-C), 65,5 (t, 12-C/13-C), 65,2 (t, 12-C/13-C), 45,2 (s, 4-C), 34,1 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C), 31,6 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C), 30,2 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C), 27,0 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C), 21,9 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C), 20,7 (q, 11-C) ppm; **HRMS** (ESI): berechnet für C₁₃H₁₉O₃⁺: 223,1329 [M + H]⁺, gefunden 223,1328 [M + H]⁺.

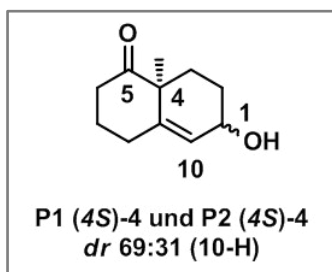


Hauptprodukt (4S)-10:

$R_f = 0,44$ (100% EtOAc, KMnO₄); $t_{ret} = 22,93$ min, **Hauptfragmente (EI):** 55, 65, 77, 87, 91, 99, 105, 120, 206, **224**; **¹H-NMR** (400 MHz, CDCl₃, CHCl₃ = 7,26 ppm) $\delta = 5,46$ (m, 1H, 10-H), 4,20-4,26 (m, 1H, 1-H), 3,89-3,99 (m, 4H, 12-H, 13-H), 2,21-2,30 (m, 1H, 3a-H), 1,98-2,05 (m, 2H, 3b-H, 2a-H), 1,85-1,89 (m, 1H, 6-H/7-H/8-H), 1,78-1,83 (m, 1H, 6-H/7-H/8-H), 1,61-1,72 (m, 3H, 6-H/7-H/8-H), 1,38-1,46 (m, 2H, 2b-H, 6-H/7-H/8-H), 1,25 (s, 3H, 11-H) ppm; **¹³C-NMR** (100 MHz, CDCl₃, CDCl₃ = 77.16 ppm) $\delta = 144,1$ (s, 5-C), 126,4 (d, 10-C), 113,1 (s, 9-C), 67,8 (d, 1-C), 65,4 (t, 12-C/13-C), 65,1 (t, 12-C/13-C), 44,2 (s, 4-C), 30,9 (t, 3-C), 30,6 (t, 6-C/7-C/8-C), 29,5 (t, 2-C), 26,6 (t, 6-C/7-C/8-C), 23,1 (t, 6-C/7-C/8-C), 22,3 (q, 11-C) ppm; **HRMS** (ESI): berechnet für C₁₃H₂₁O₃⁺: 225,1485 [M + H]⁺, gefunden 225,1483 [M + H]⁺.

Nebenprodukt (4S)-10:

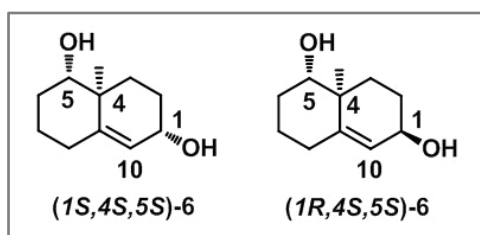
$R_f = 0,30$ (100% EtOAc, $KMnO_4$ sehr schwach); $t_{ret} = 21,70$ min, **Hauptfragmente (EI):** 55, 65, 77, 87, 91, 99, 105, 120, 206, **224**; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3 = 7,26$ ppm) $\delta = 5,61$ -5,64 (m, 1H, 10-H), 4,01-4,04 (m, 1H, 1-H), 3,92-4,00 (m, 4H, 12-H, 13-H), 1,18 (s, 3H, 11-H) ppm; ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$, $CDCl_3 = 77,16$ ppm) $\delta = 146,2$ (s, 5-C), 124,1 (d, 10-C), 113,2 (s, 9-C), 67,3 (t, 12-C/13-C), 65,2 (t, 12-C/13-C), 64,4 (d, 1-C), 44,2 (s, 4-C), 21,7 (q, 11-C) ppm. Die NMR-Daten können nicht vollständig angegeben werden, da die NMR-Spektren undefinierte Nebenprodukte aufweisen, welche den Bereich der CH_2 -Gruppen überlagern. **HRMS** (ESI): berechnet für $C_{13}H_{21}O_3^+$: 225,1485 $[M + H]^+$, gefunden 225,1484 $[M + H]^+$.

**Produktgemisch P1 (4S)-4 und P2 (4S)-4:**

$R_f = 0,42$ (100% EtOAc, $KMnO_4$); t_{ret} (P1) = 14,03 min, **Hauptfragmente (EI):** 55, 65, 79, 91, 105, 124, 137, 147, 162, **180**; t_{ret} (P2) = 13,63 min, **Hauptfragmente (EI):** 55, 65, 79, 91, 105, 124, 137, 147, 162, **180**; 1H -NMR (400 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3 = 7,26$ ppm) $\delta = 5,62$ -5,63 (m, 1H, 10-H (P2)), 5,50-5,51 (m, 1H, 10-H (P1)), 4,13-4,18 (m, 1H, 1-H (P1)), 4,09-4,12 (m, 1H, 1-H (P2)), 2,60-2,70 (m, 1H (P1), 1H (P2), 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 2,50-2,59 (m, 1H (P1), 1H (P2), 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 2,37-2,40 (m, 1H (P1), 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 2,33-2,36 (m, 1H (P2), 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 2,24-2,27 (m, 1H (P1), 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 2,21-2,23 (m, 1H (P2), 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 2,10-2,18 (m, 1H (P2), 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 1,97-2,07 (m, 2-3H (P1), 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 1,86-1,93 (m, 1H (P1), 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 1,77-1,83 (m, 1H (P2), 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 1,44-1,72 (m, 2-3H, (P1), 4H (P2), 2-H/3-H/6-H/7-H/8-H), 1,34 (s, 3H, 11-H (P1)), 1,27 (s, 3H, 11-H (P2)) ppm; ^{13}C -NMR (100 MHz, $CDCl_3$, $CDCl_3 = 77,16$ ppm) $\delta = 213,8$ (s, 5-C (P1)), 213,2 (s, 5-C (P2)), 144,7 (s, 9-C (P2)), 143,4 (s, 9-C (P1)), 127,1 (d, 10-C (P1)), 125,6 (d, 10-C (P2)), 67,3 (d, 1-C (P1)), 64,7 (d, 1-C (P2)), 50,7 (s, 4-C (P2)), 50,6 (s, 4-C (P1)), 38,3 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C (P1)), 38,1 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C (P2)), 31,2 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C (P1)), 31,2 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C (P2)), 29,0 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C (P1)), 28,8 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C (P1)), 28,3 (t,

6 Anhang

2-C/3-C/6-C/7-C/8-C (P2)), 26,2 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C (P2)), 25,3 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C (P2)), 25,1 (q, 11-C (P1)), 25,0 (t, 2-C/3-C/6-C/7-C/8-C (P2)), 24,6 (q, 11-C (P2)) ppm; **HRMS** (ESI): berechnet für $C_{11}H_{17}O_2^+$: 181,1223 $[M + H]^+$, gefunden 181,1221 $[M + H]^+$.



(1S,4S,5S)-6:

$R_f = 0,36$ (100% EtOAc, $KMnO_4$); $t_{ret} = 15,75$ min, **Hauptfragmente (ED)**: 55, 67, 79, 91, 105, 118, 131, 146, 164, **182**; ^1H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3 = 7,26$ ppm) $\delta = 5,42$ (s, 1H, 10-H), 4,17-4,22 (m, 1H, 1-H), 3,27 (dd, $J = 4,1, 11,6$ Hz, 1H, 5-H), 2,10-2,19 (m, 1H, 8a-H), 1,94-2,02 (m, 2H, 2a-H, 8b-H), 1,82-1,86 (m, 1H, 3a-H), 1,74-1,81 (m, 2H, 6a-H, 7a-H), 1,54-1,58 (m, 1H, 6b-H), 1,44-1,49 (m, 2H, 2b-H, 3b-H), 1,28-1,34 (m, 1H, 7b-H), 1,07 (s, 3H, 11-H) ppm. $^{13}C-NMR$ (100 MHz, $CDCl_3$, $CDCl_3 = 77,16$ ppm) $\delta = 144,9$ (s, 9-C), 126,1 (d, 10-C), 79,2 (d, 5-C), 67,8 (d, 1-C), 40,8 (s, 4-C), 33,6 (t, 3-C), 31,5 (t, 8-C), 30,9 (t, 6-C), 29,0 (t, 2-C), 24,7 (t, 7-C), 16,9 (q, 11-C) ppm; **HRMS** (ESI): berechnet für $C_{11}H_{19}O_2^+$: 183,1380 $[M + H]^+$, gefunden 183,1379 $[M + H]^+$.

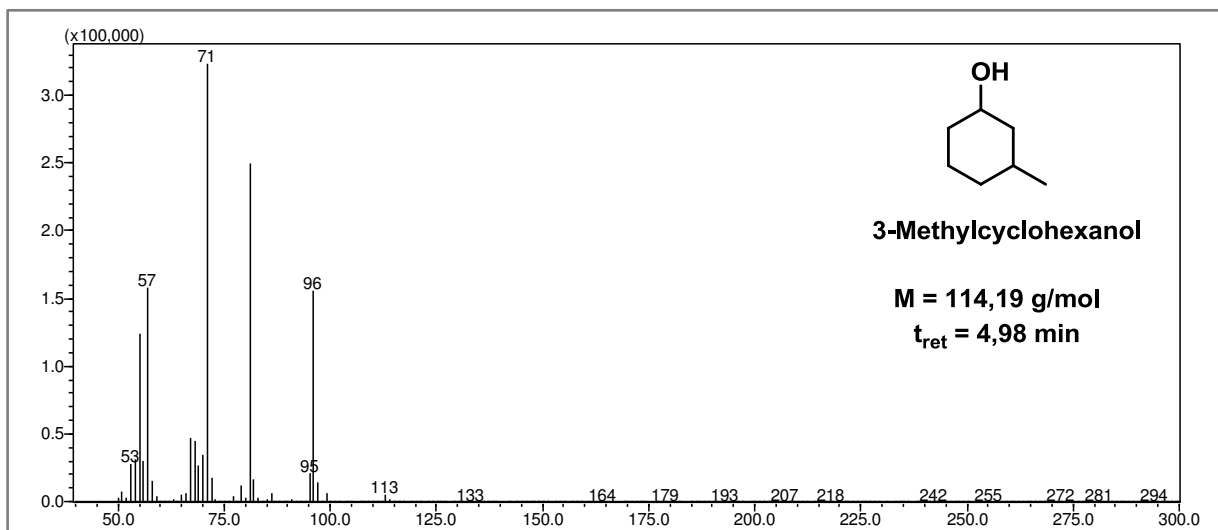
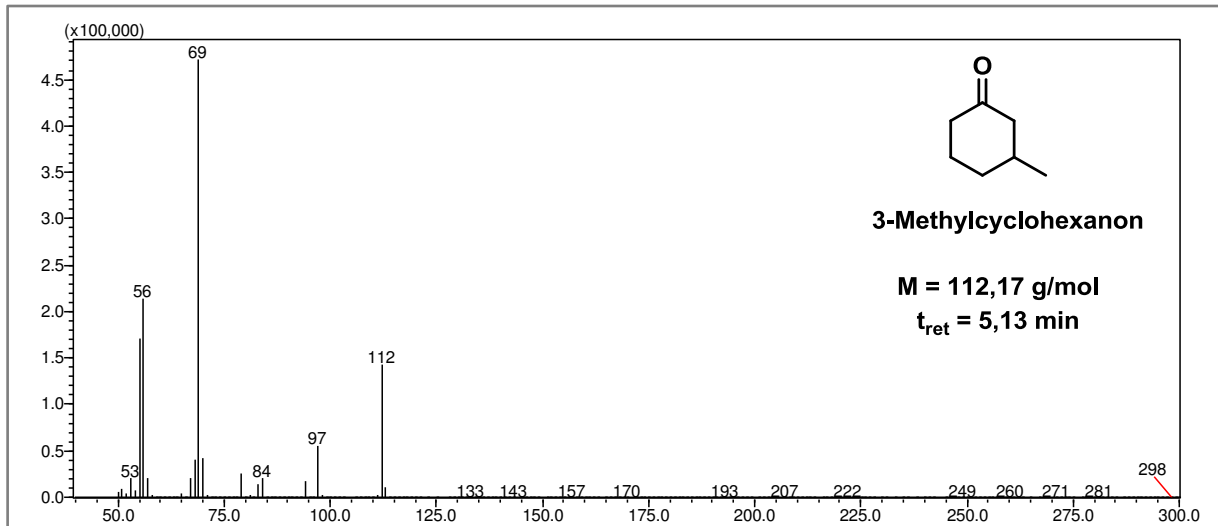
(1R,4S,5S)-6:

$R_f = 0,26$ (100% EtOAc, $KMnO_4$); $t_{ret} = 15,25$ min, **Hauptfragmente (ED)**: 55, 65, 79, 91, 105, 118, 131, 146, 164; ^1H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$, $CHCl_3 = 7,26$ ppm) $\delta = 5,54-5,56$ (s, 1H, 10-H), 4,11-4,14 (m, 1H, 1-H), 3,37 (dd, $J = 4,3, 11,6$ Hz, 1H, 5-H), 1,00 (s, 3H, 11-H) ppm. $^{13}C-NMR$ (100 MHz, $CDCl_3$, $CDCl_3 = 77,16$ ppm) $\delta = 146,9$ (s, 9-C), 124,0 (d, 10-C), 78,6 (d, 5-C), 64,9 (d, 1-C), 40,8 (s, 4-C), 16,5 (q, 11-C) ppm. Die NMR-Daten können nicht vollständig angegeben werden, da die NMR-Spektren undefinierte Nebenprodukte aufweisen, welche den Bereich der CH_2 -Gruppen überlagern. **HRMS** (ESI): berechnet für $C_{11}H_{19}O_2^+$: 183,1380 $[M + H]^+$, gefunden 183,1381 $[M + H]^+$.

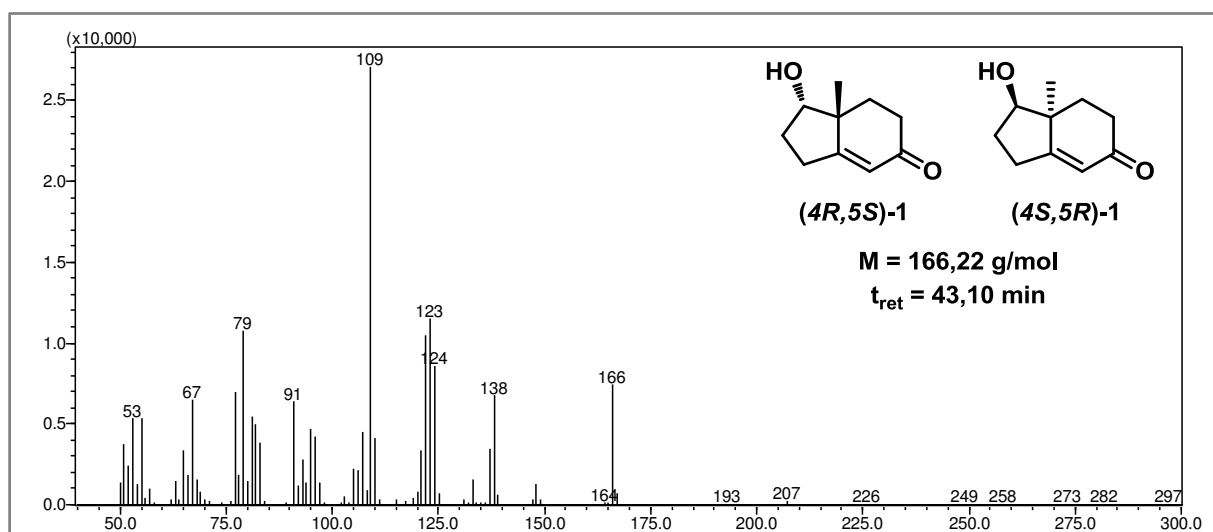
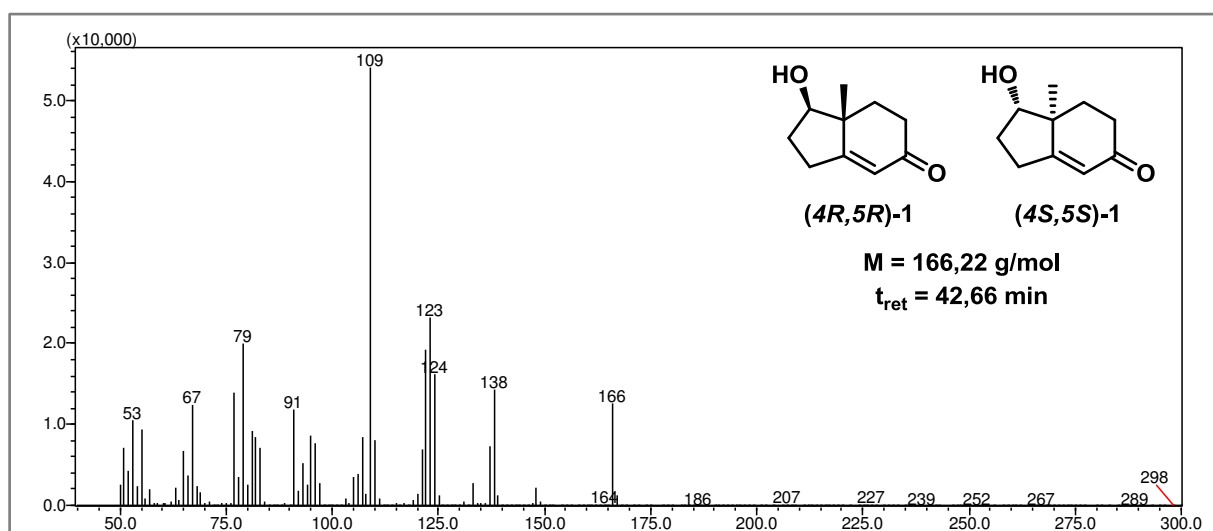
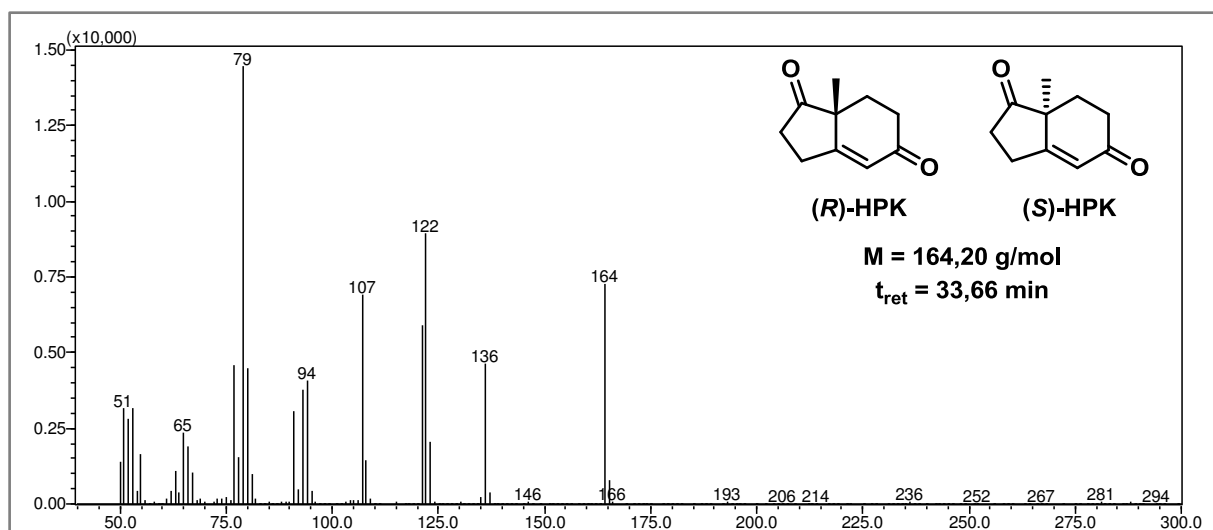
6.6 Spektrenanhang

6.6.1 EI-Spektren

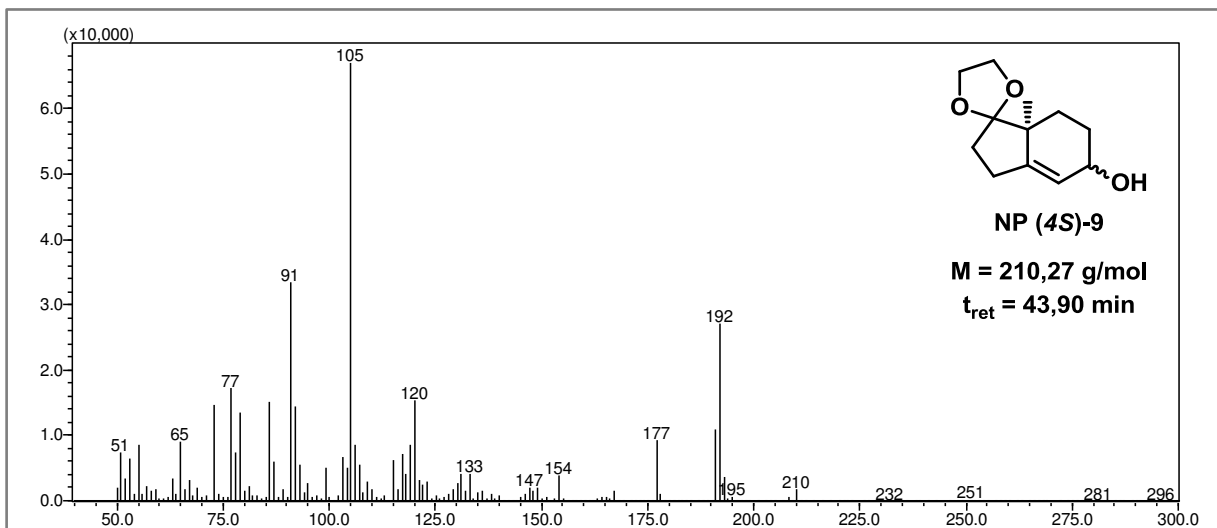
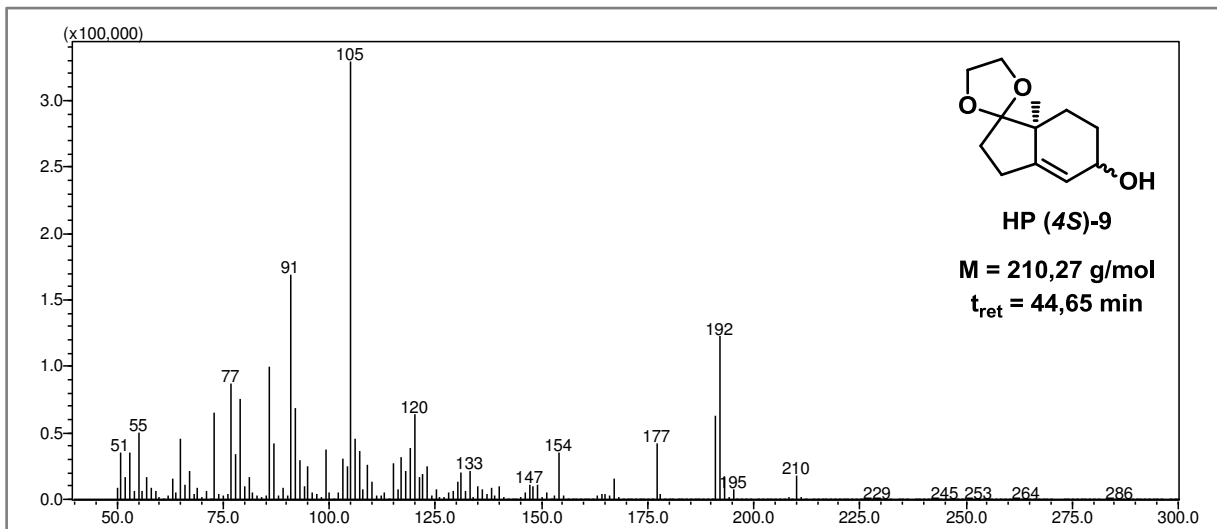
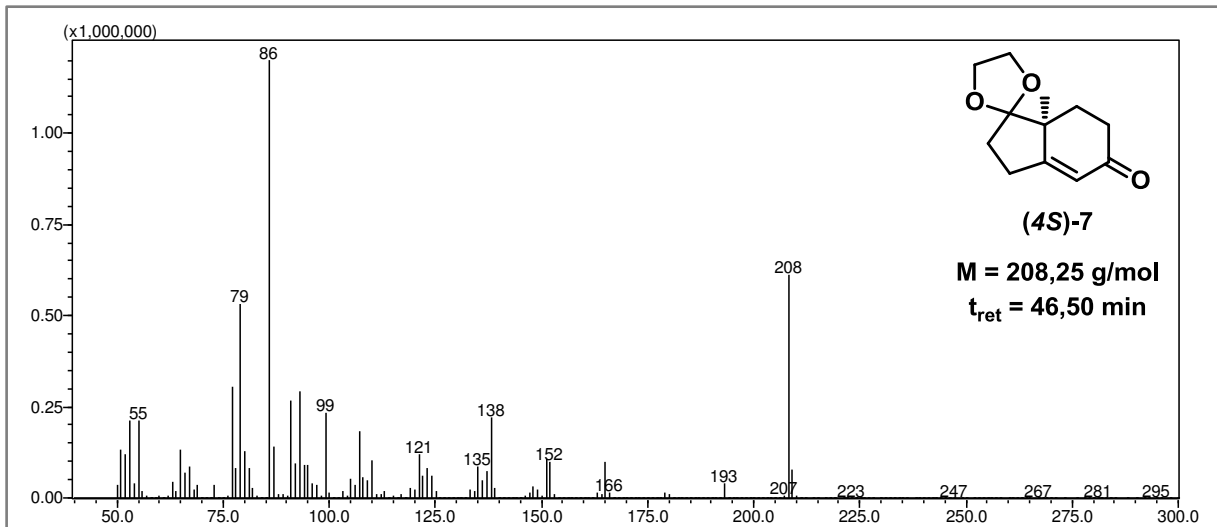
3-Methylcyclohexanon/3-Methylcyclohexanol:



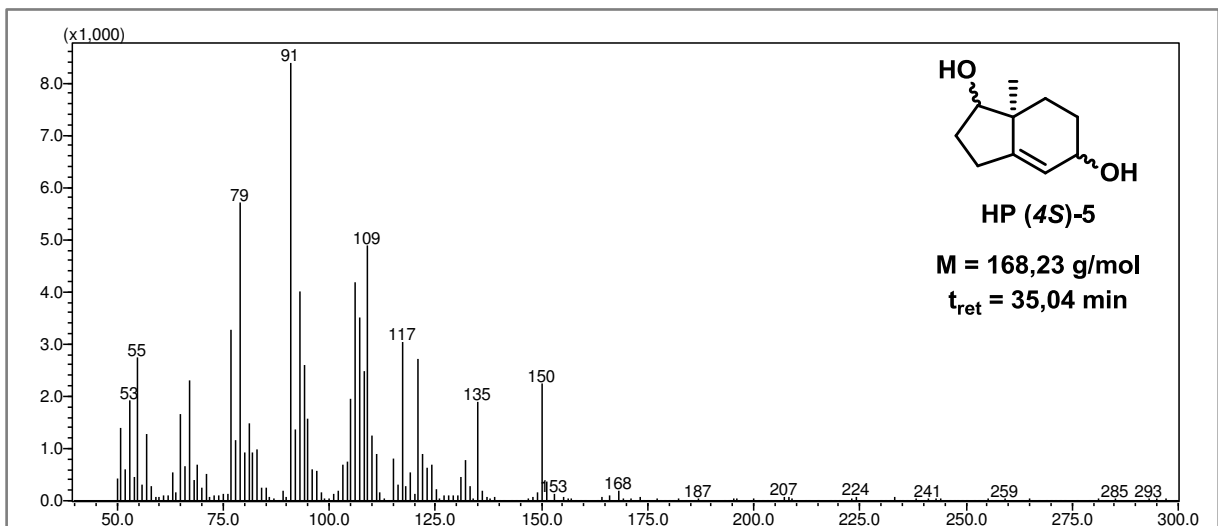
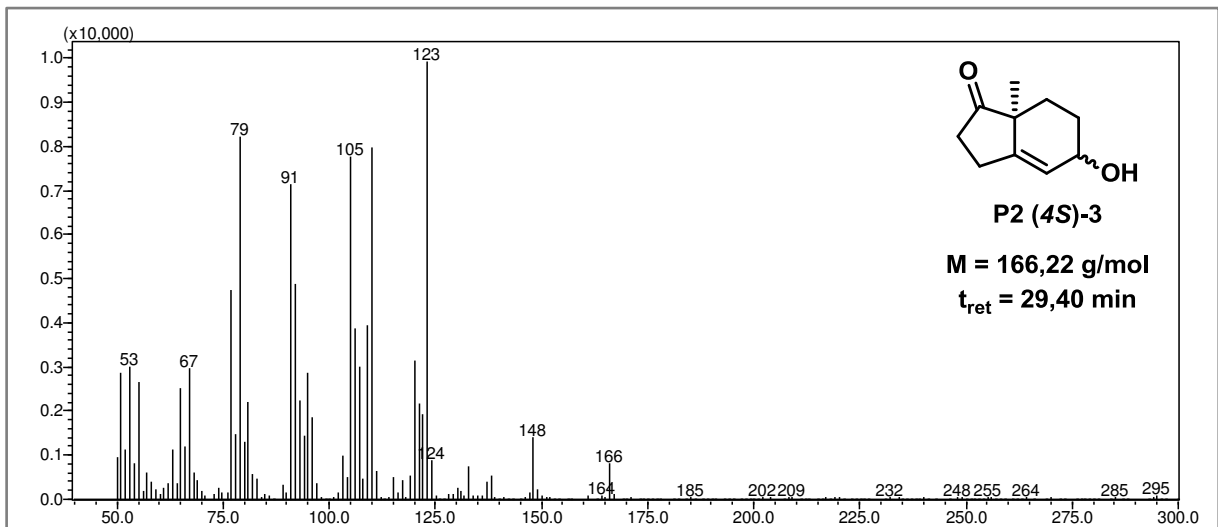
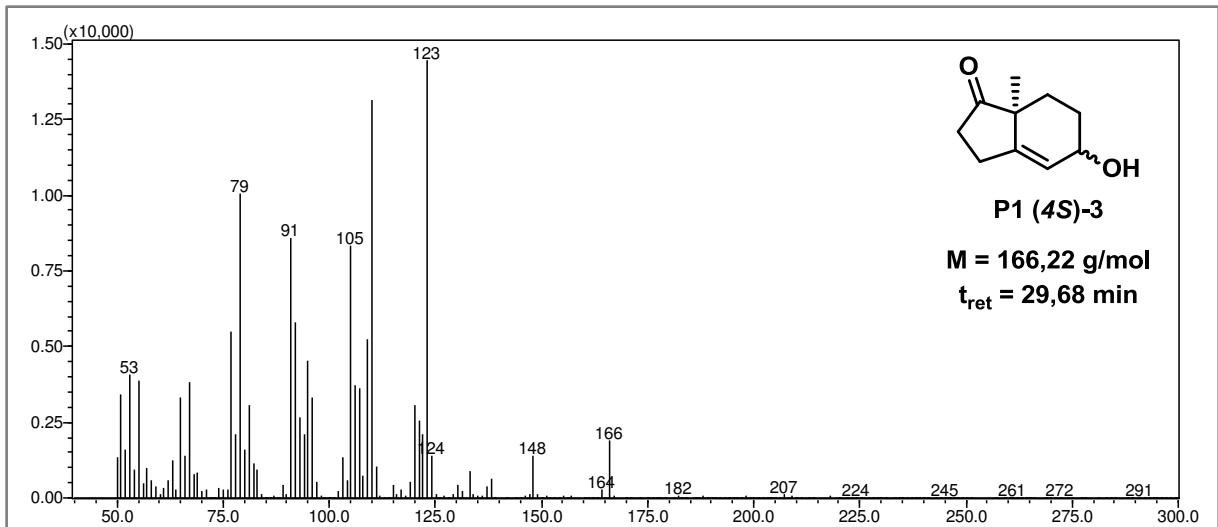
Hajos-Parrish-Keton und Derivate:



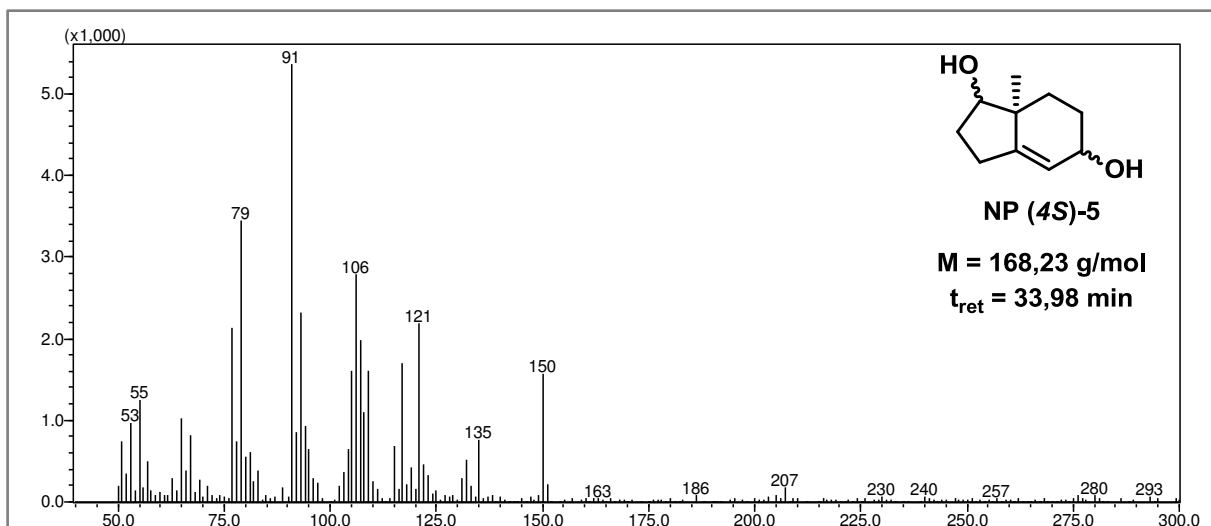
6 Anhang



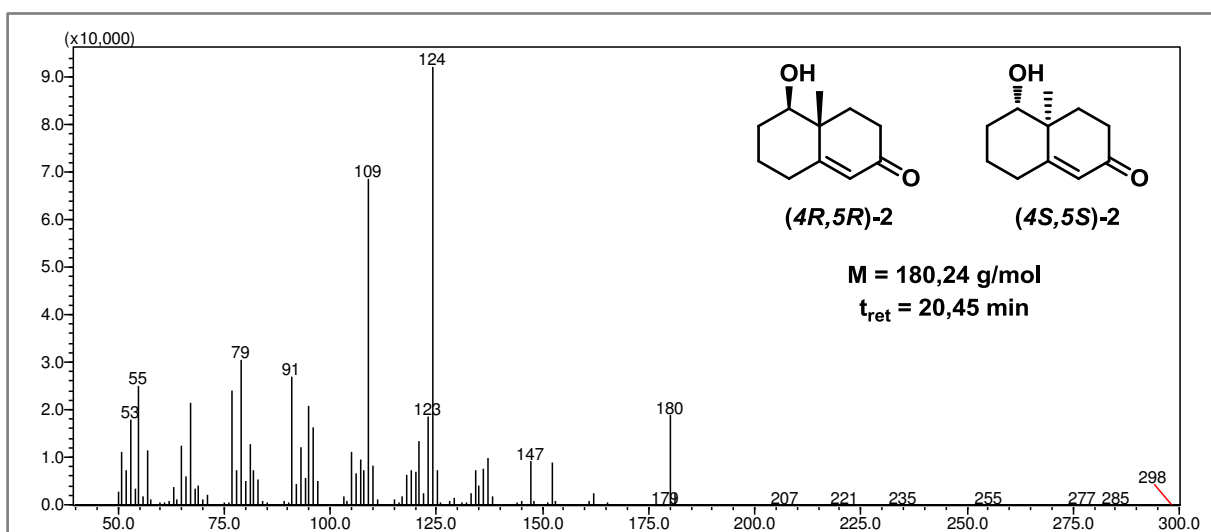
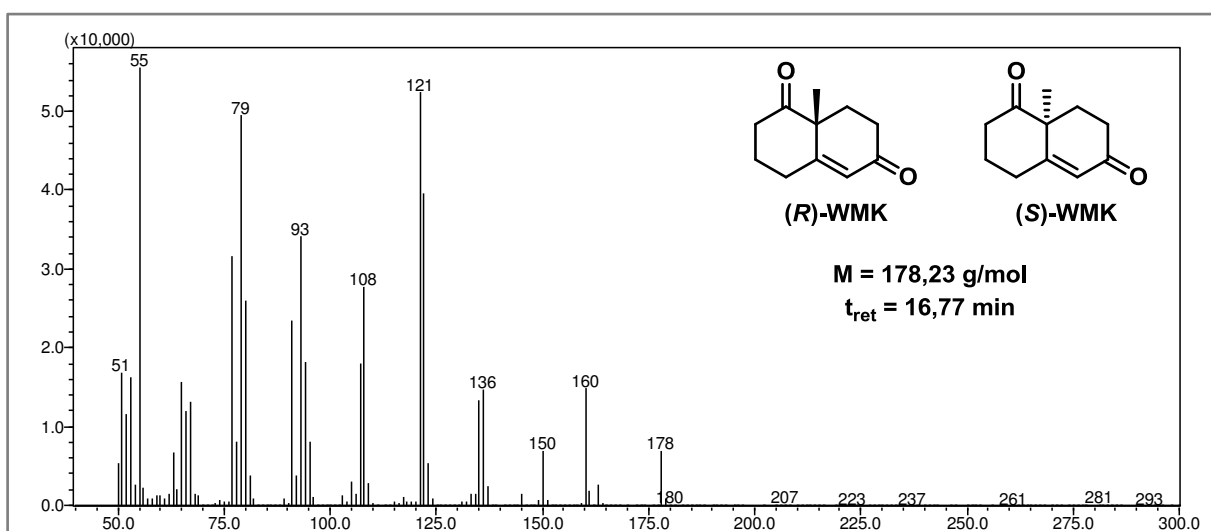
6 Anhang



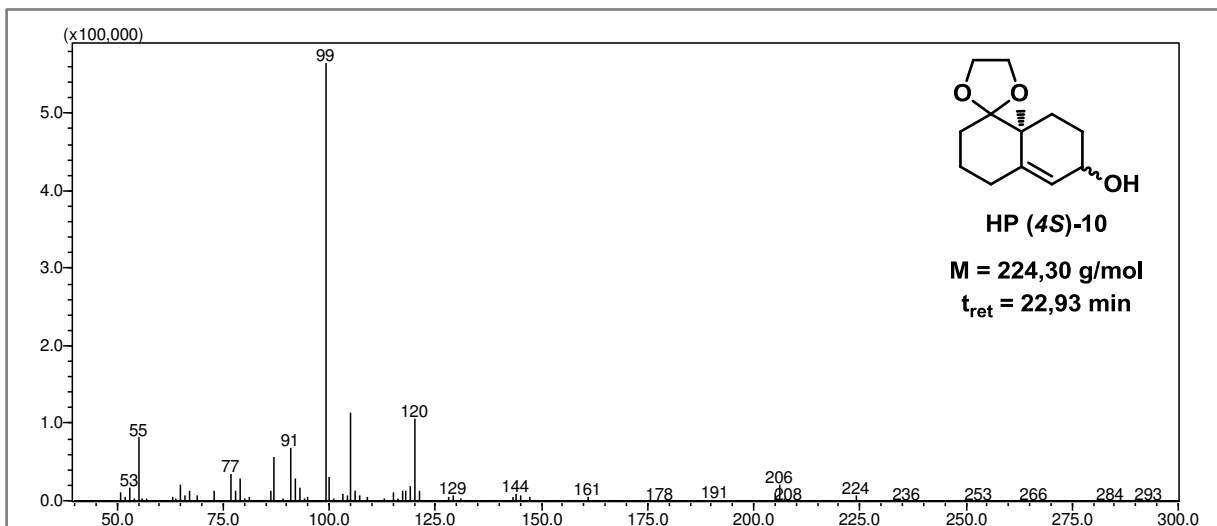
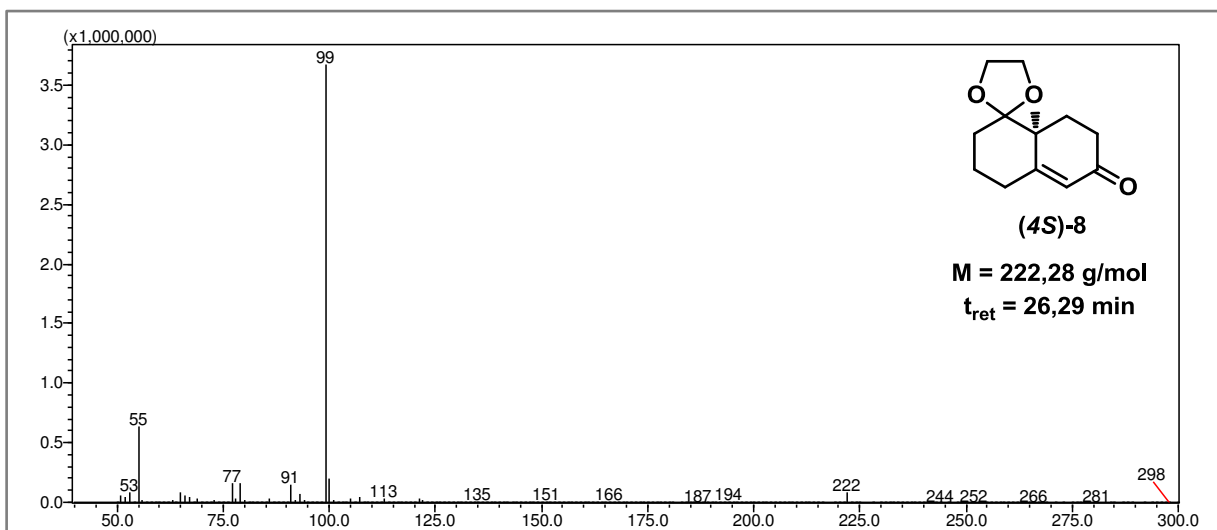
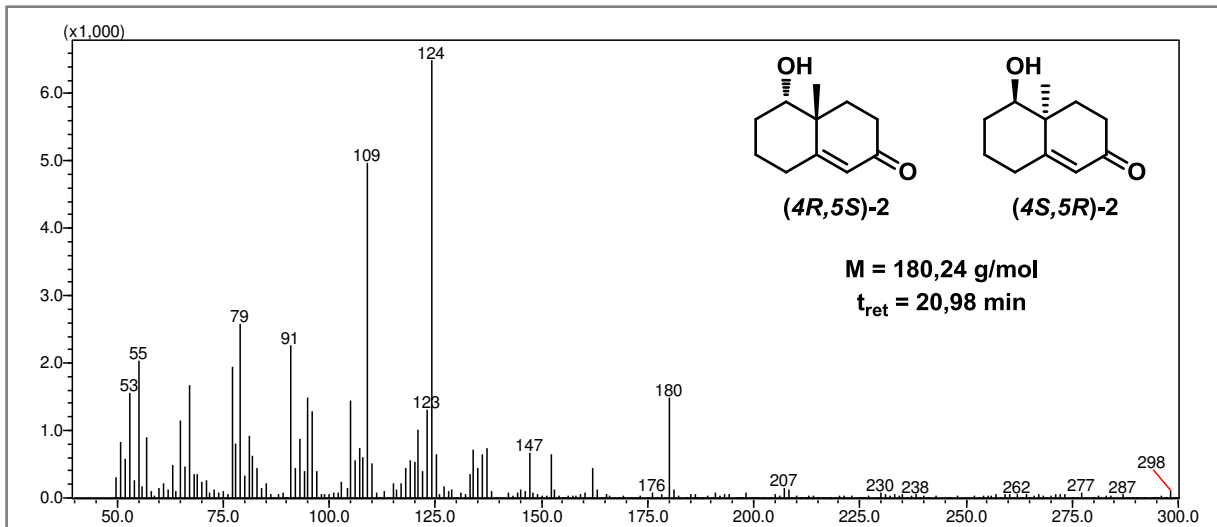
6 Anhang



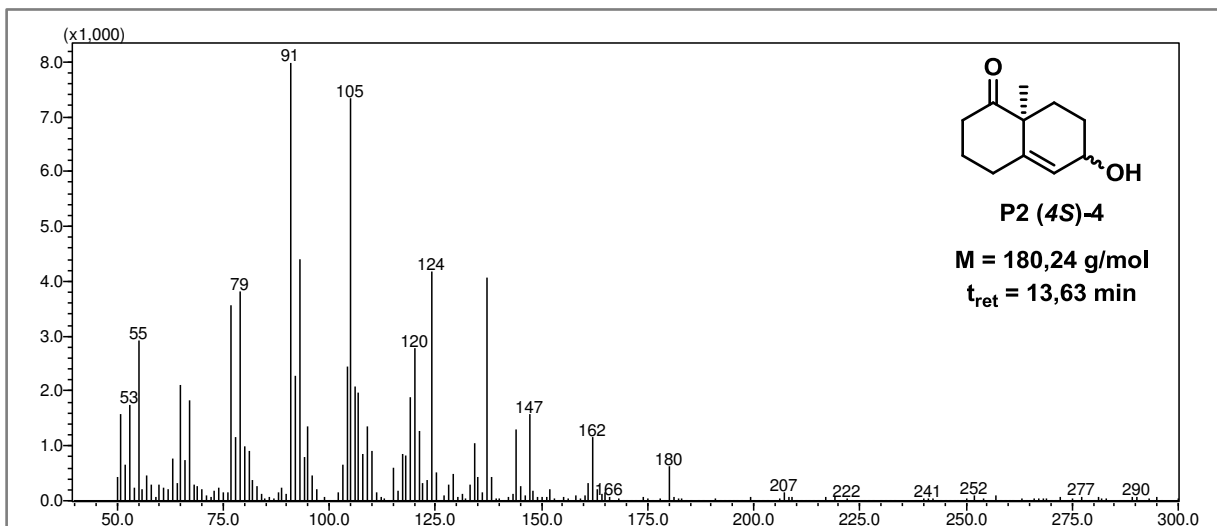
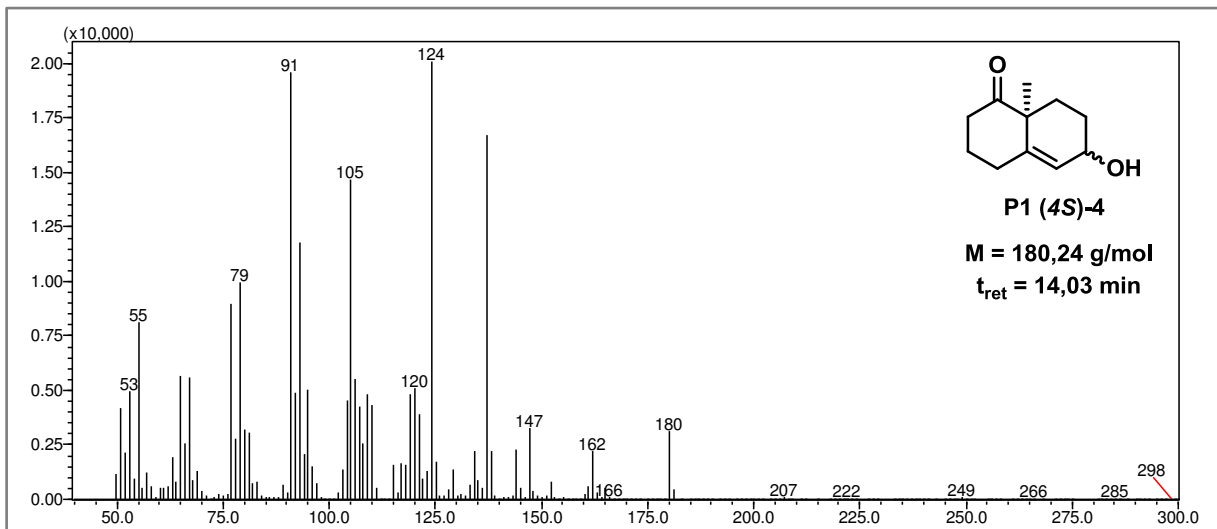
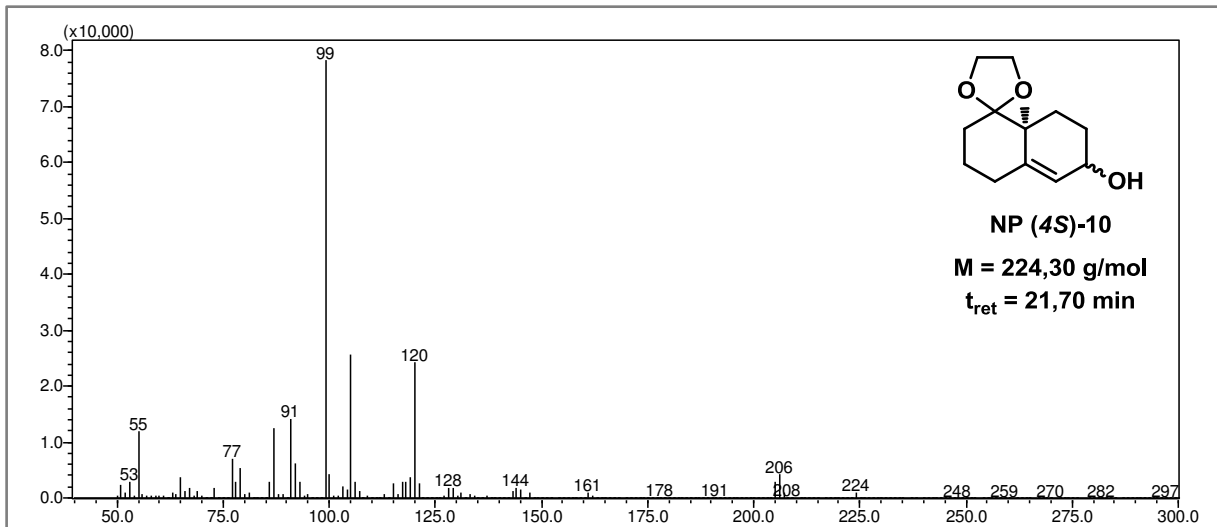
Wieland-Mischer-Keton und Derivate:



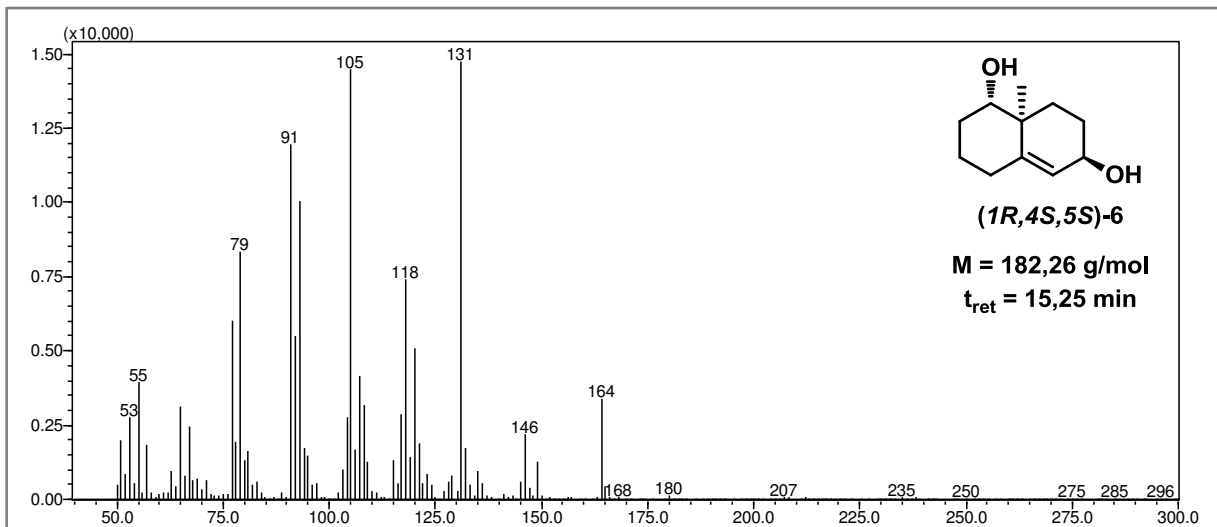
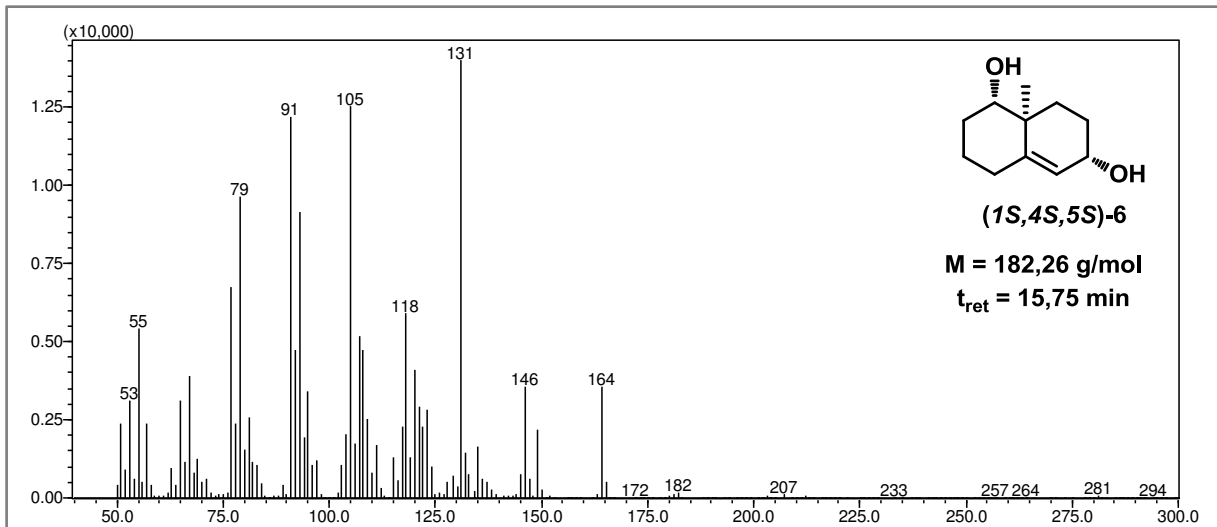
6 Anhang



6 Anhang

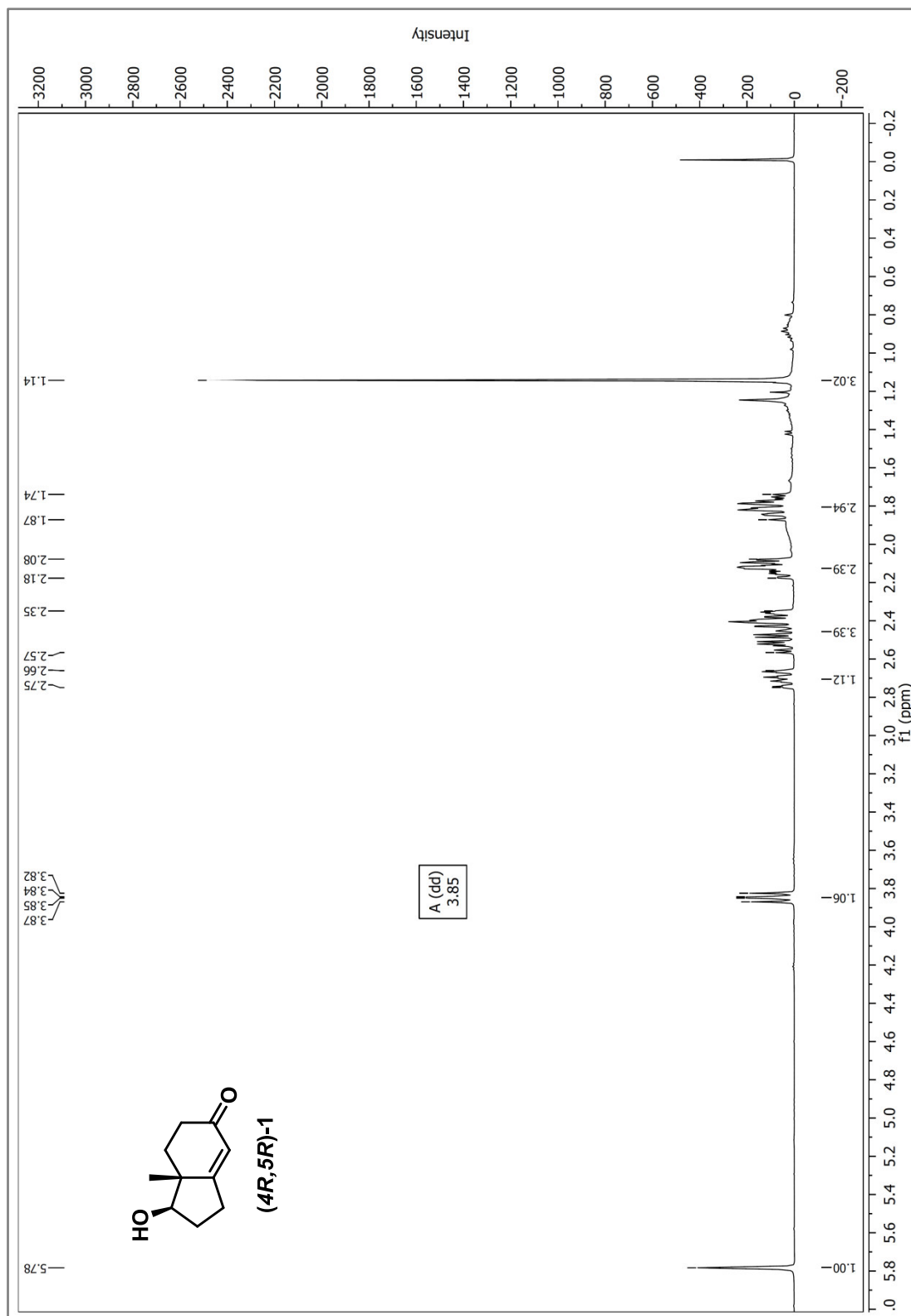


6 Anhang

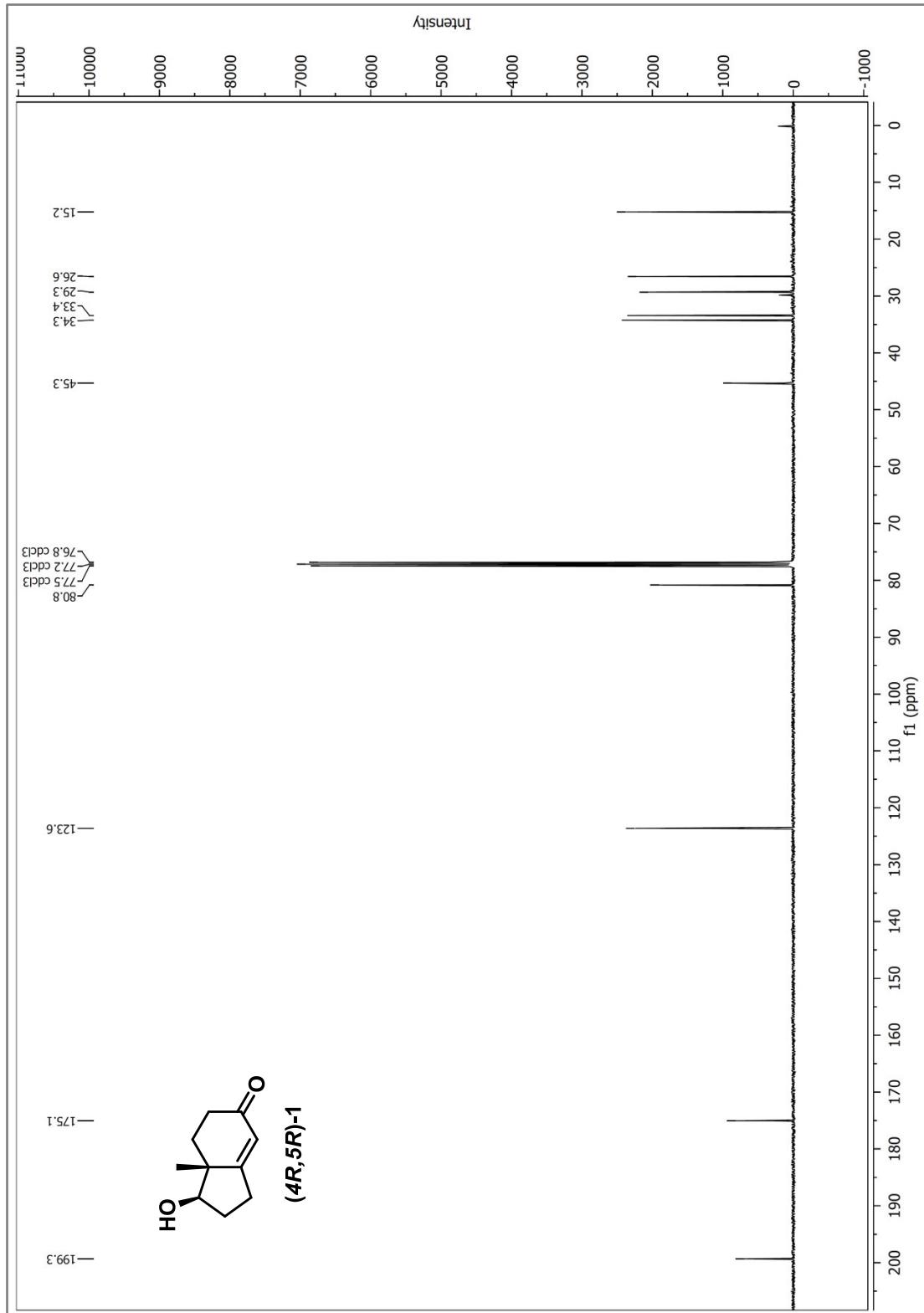


6.6.2 NMR-Spektren

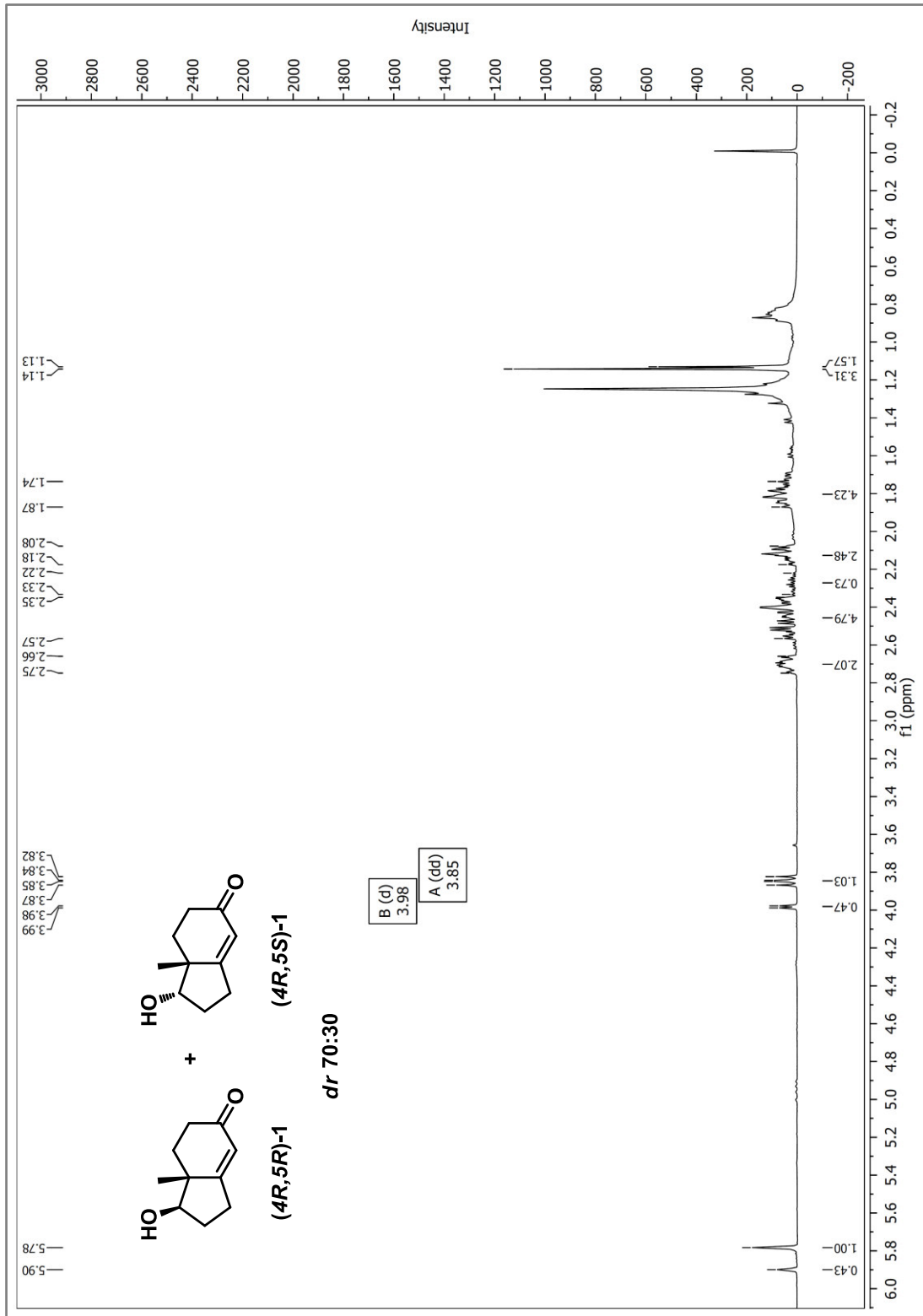
Derivate ausgehend vom Hajos-Parrish-Keton:



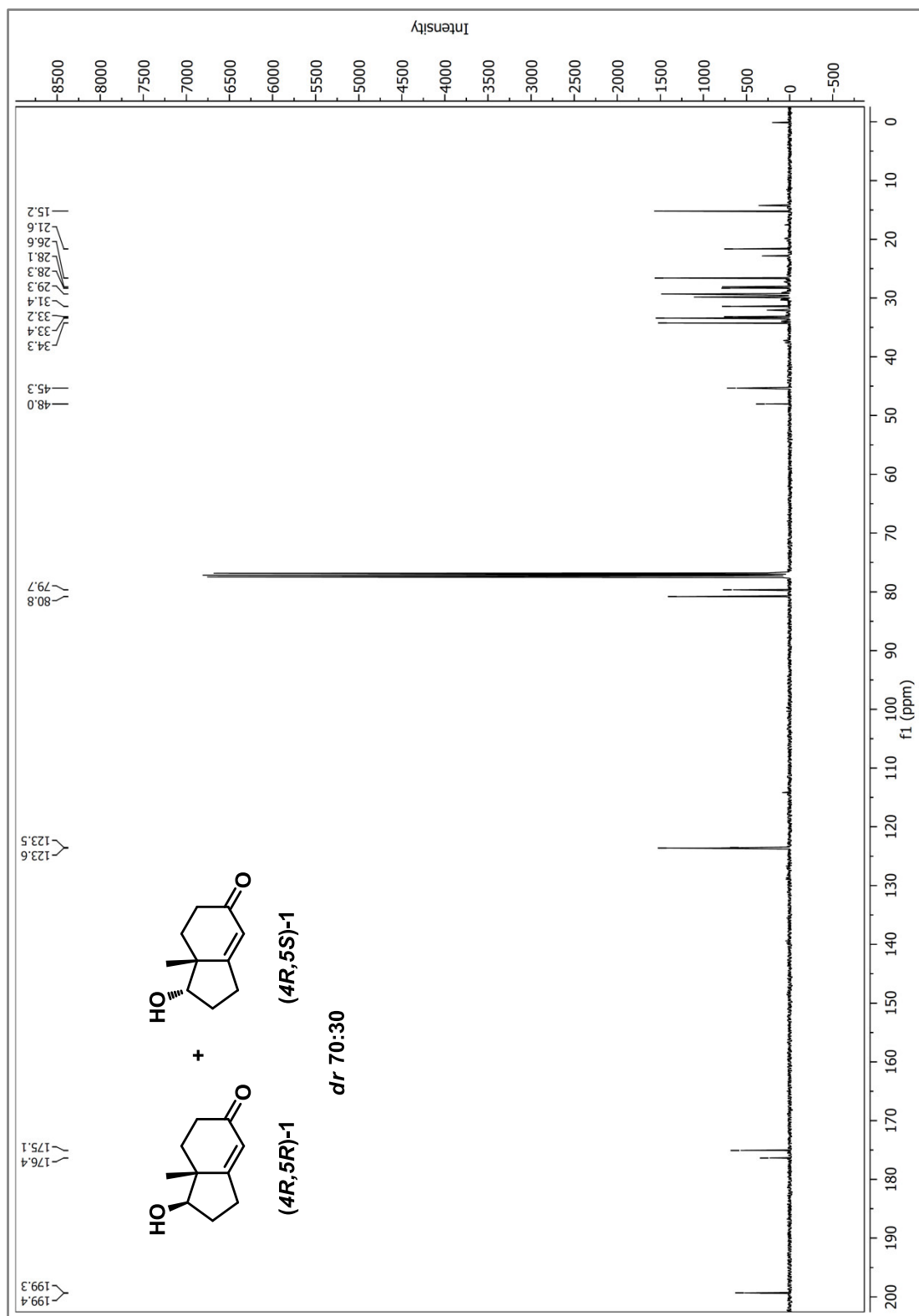
6 Anhang



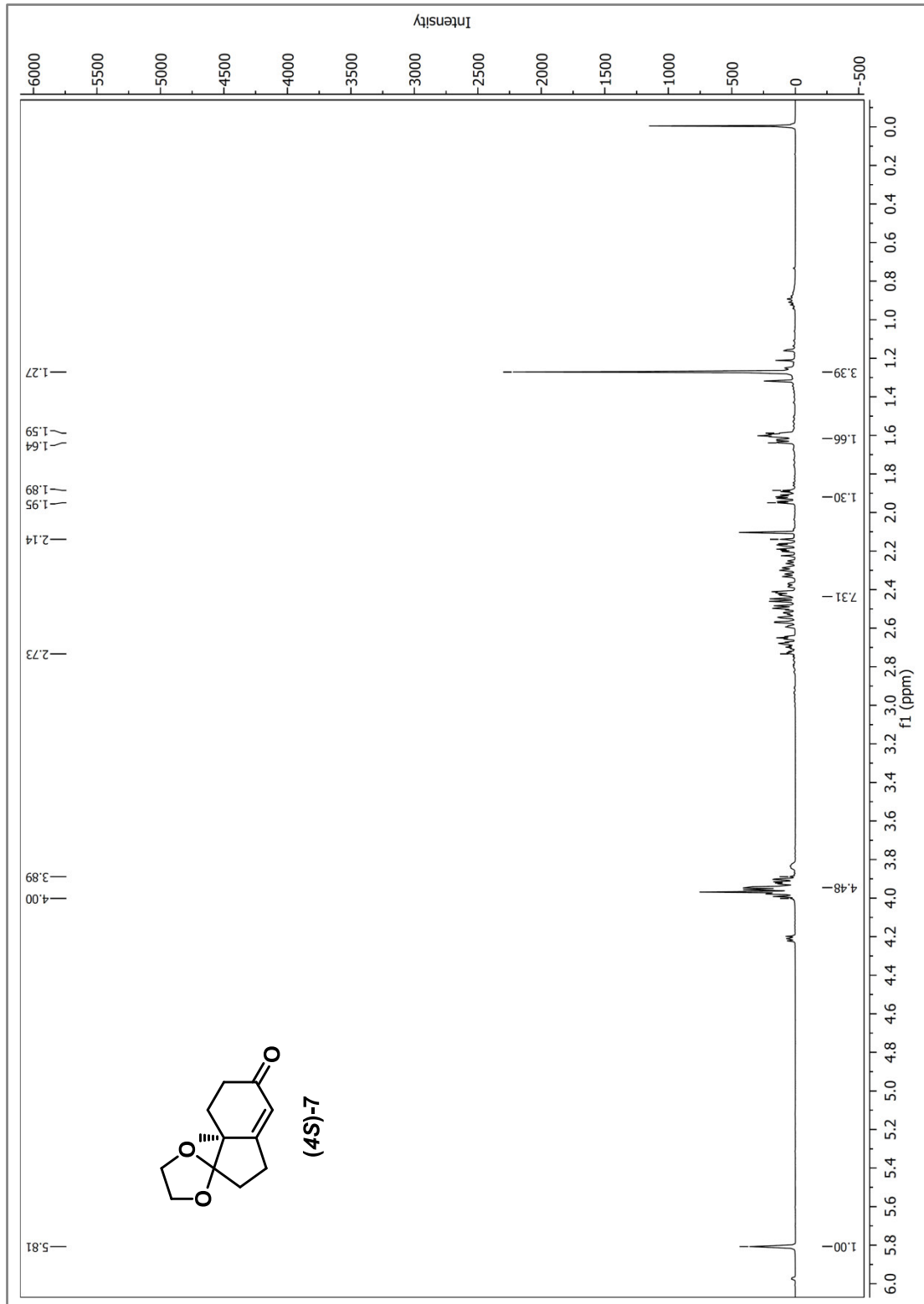
6 Anhang



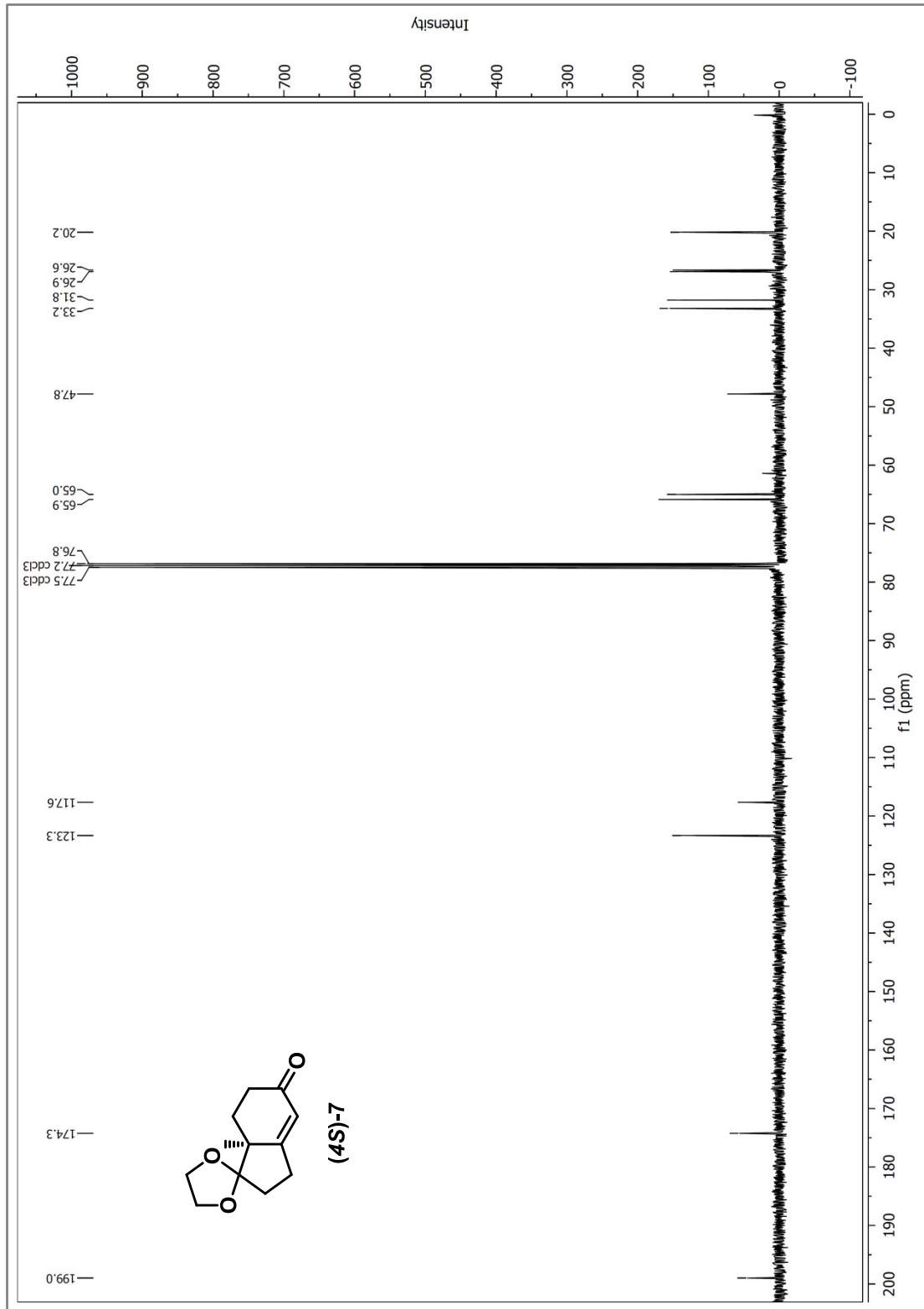
6 Anhang



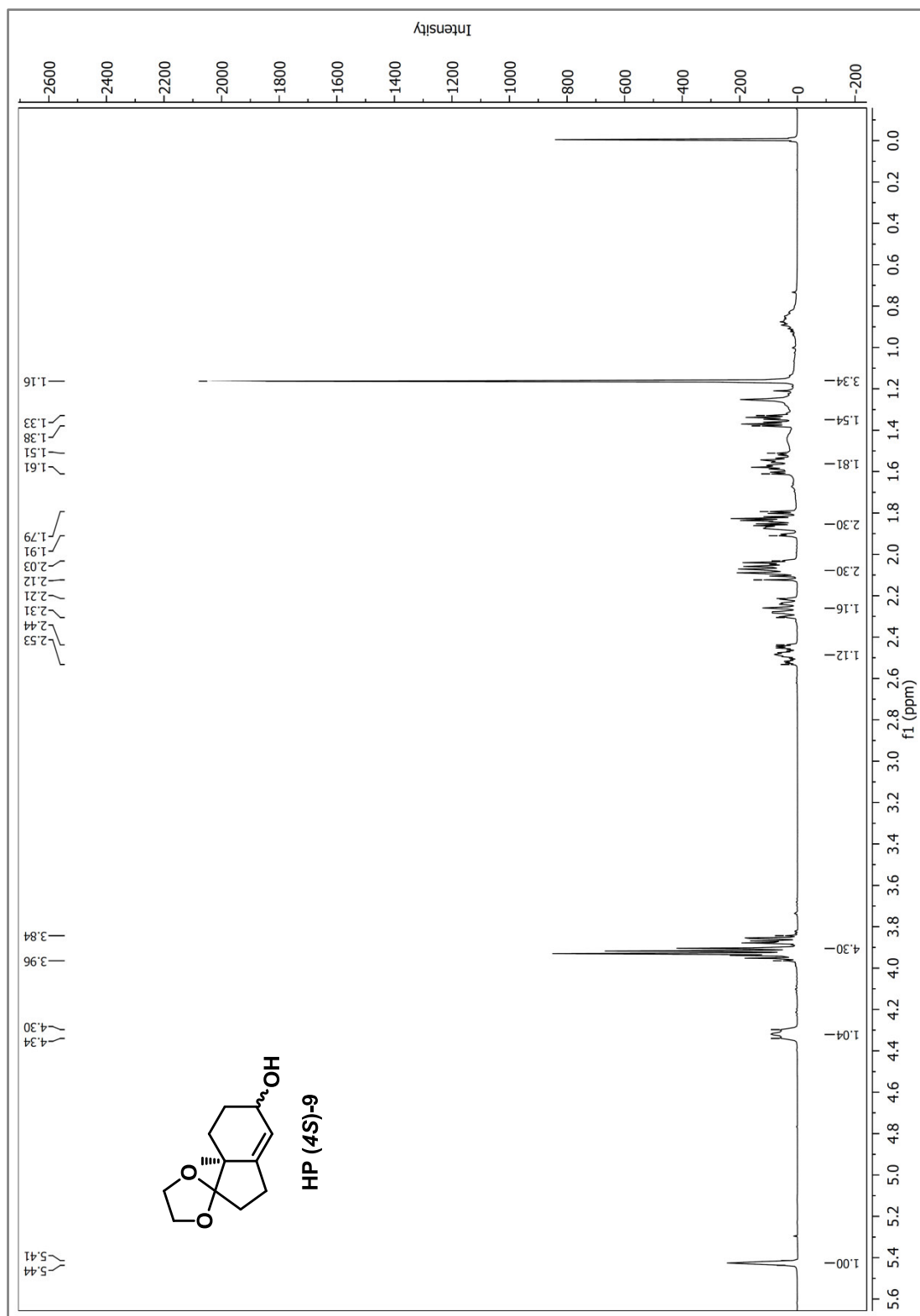
6 Anhang



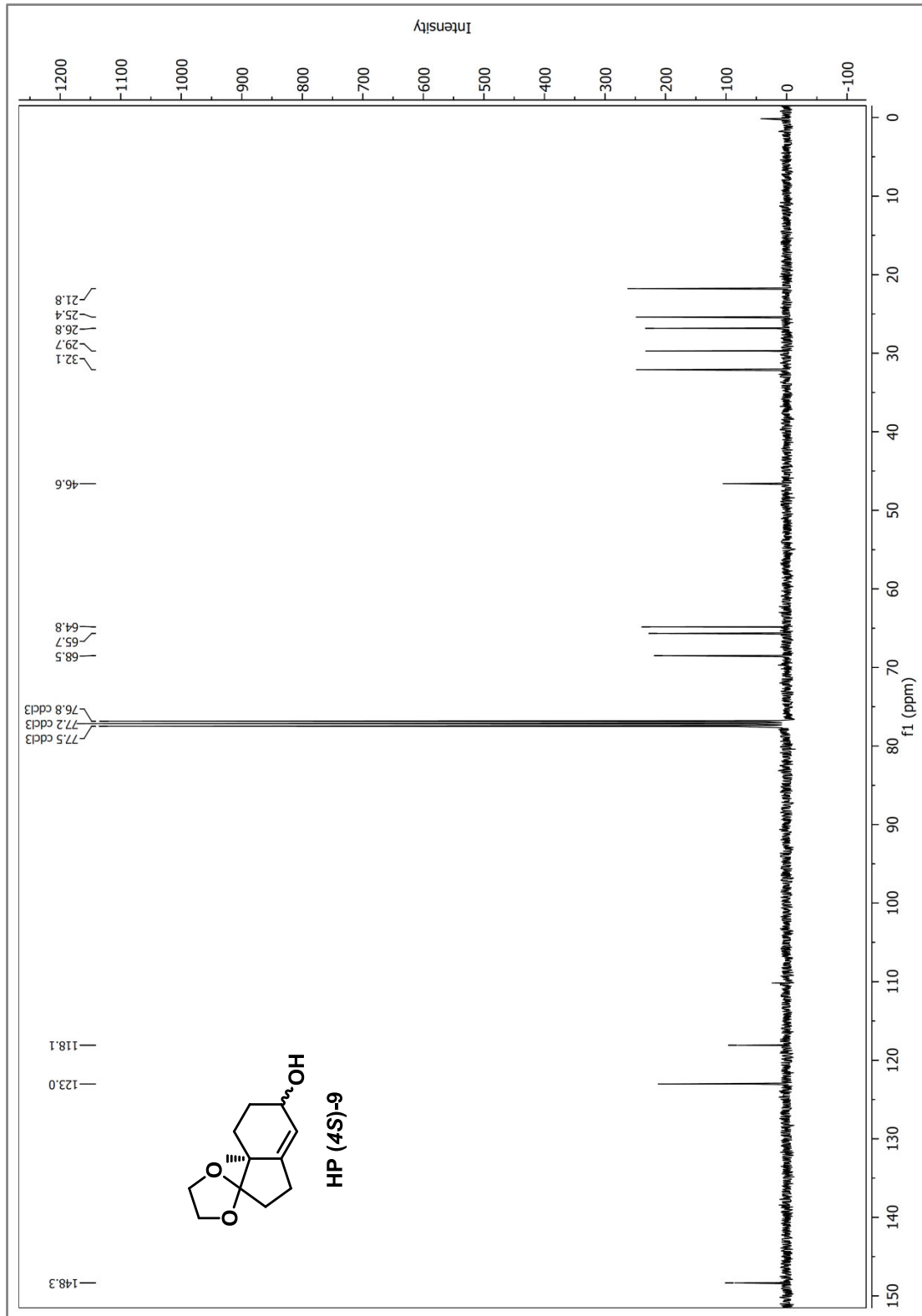
6 Anhang



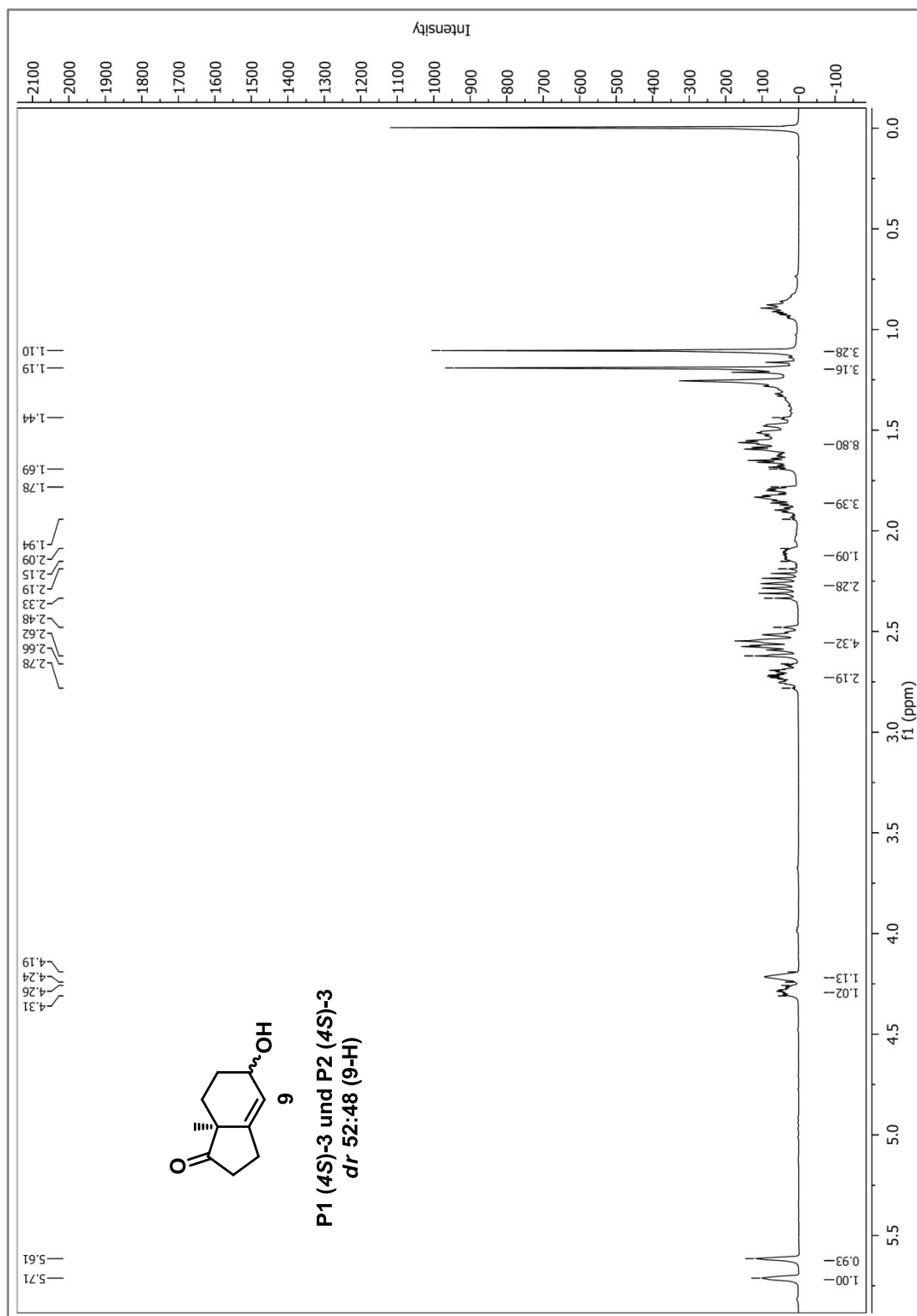
6 Anhang



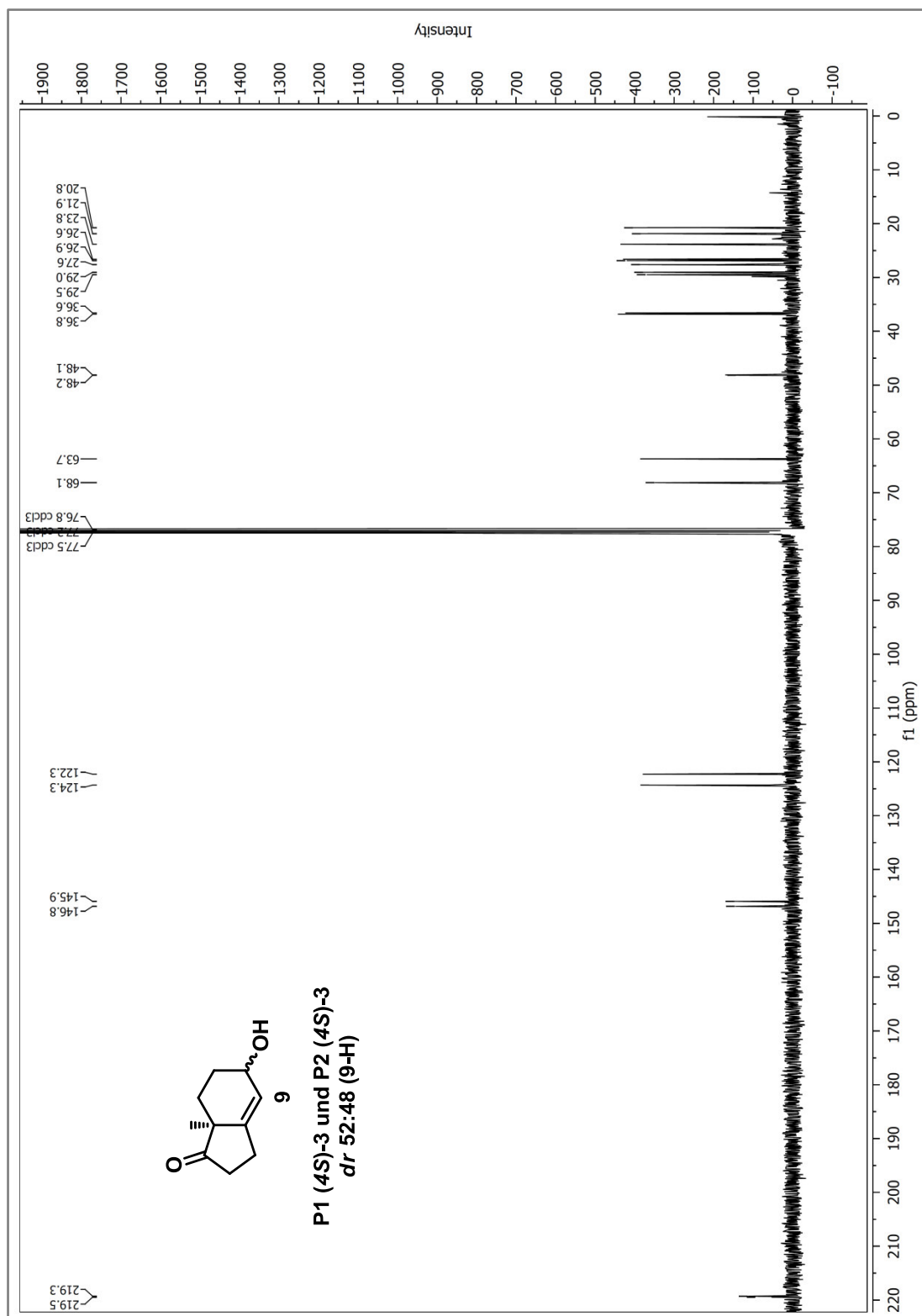
6 Anhang



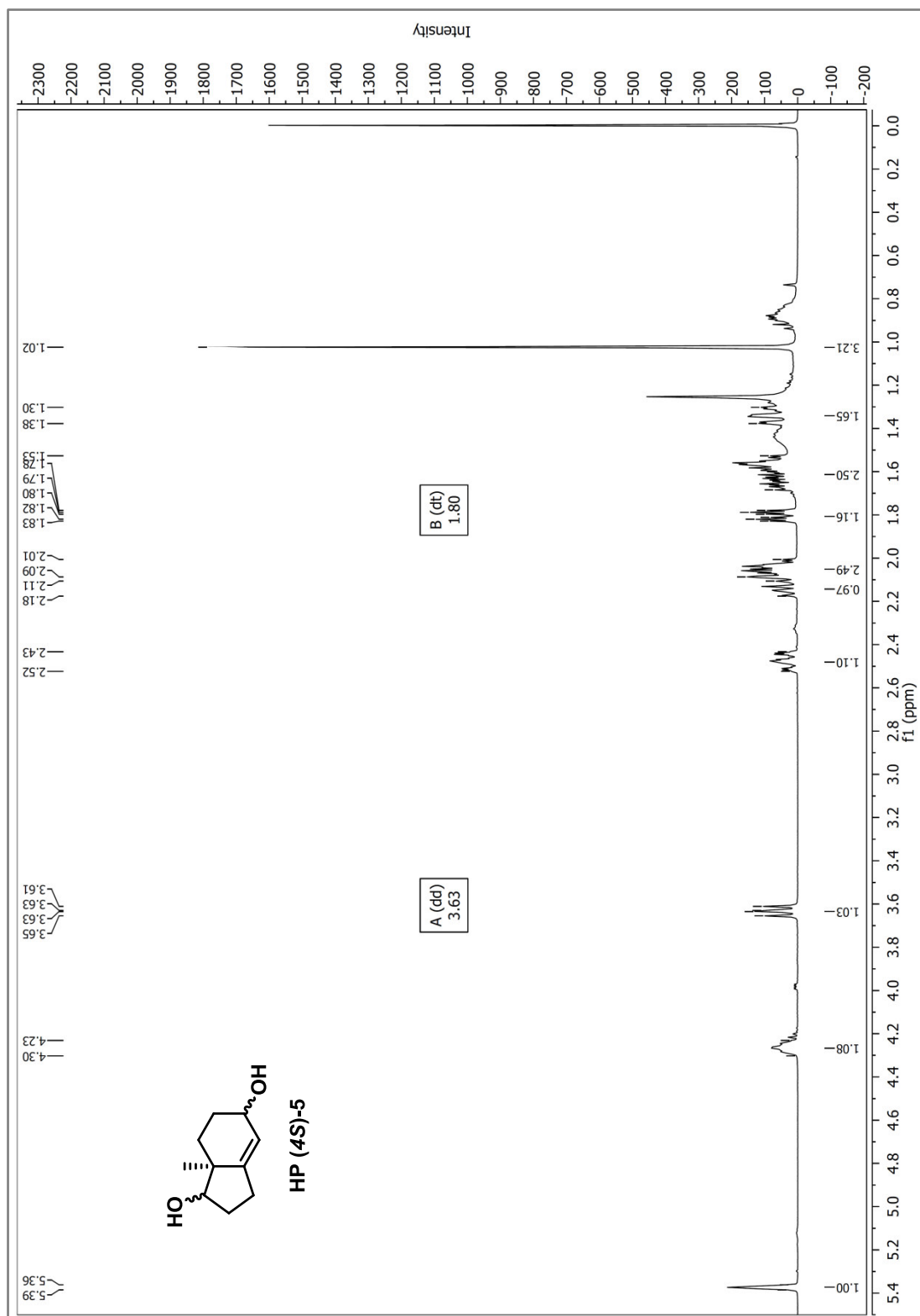
6 Anhang



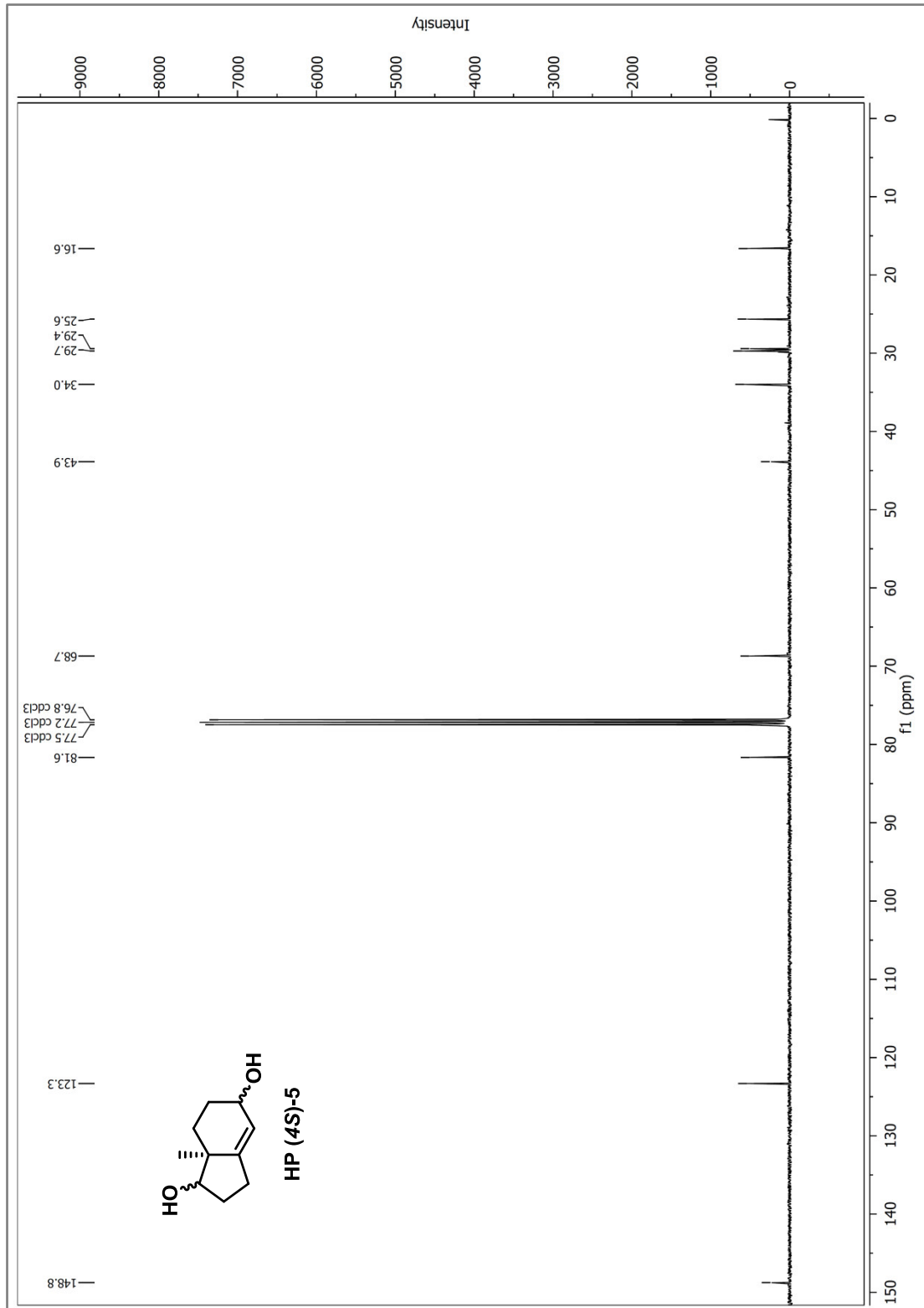
6 Anhang



6 Anhang

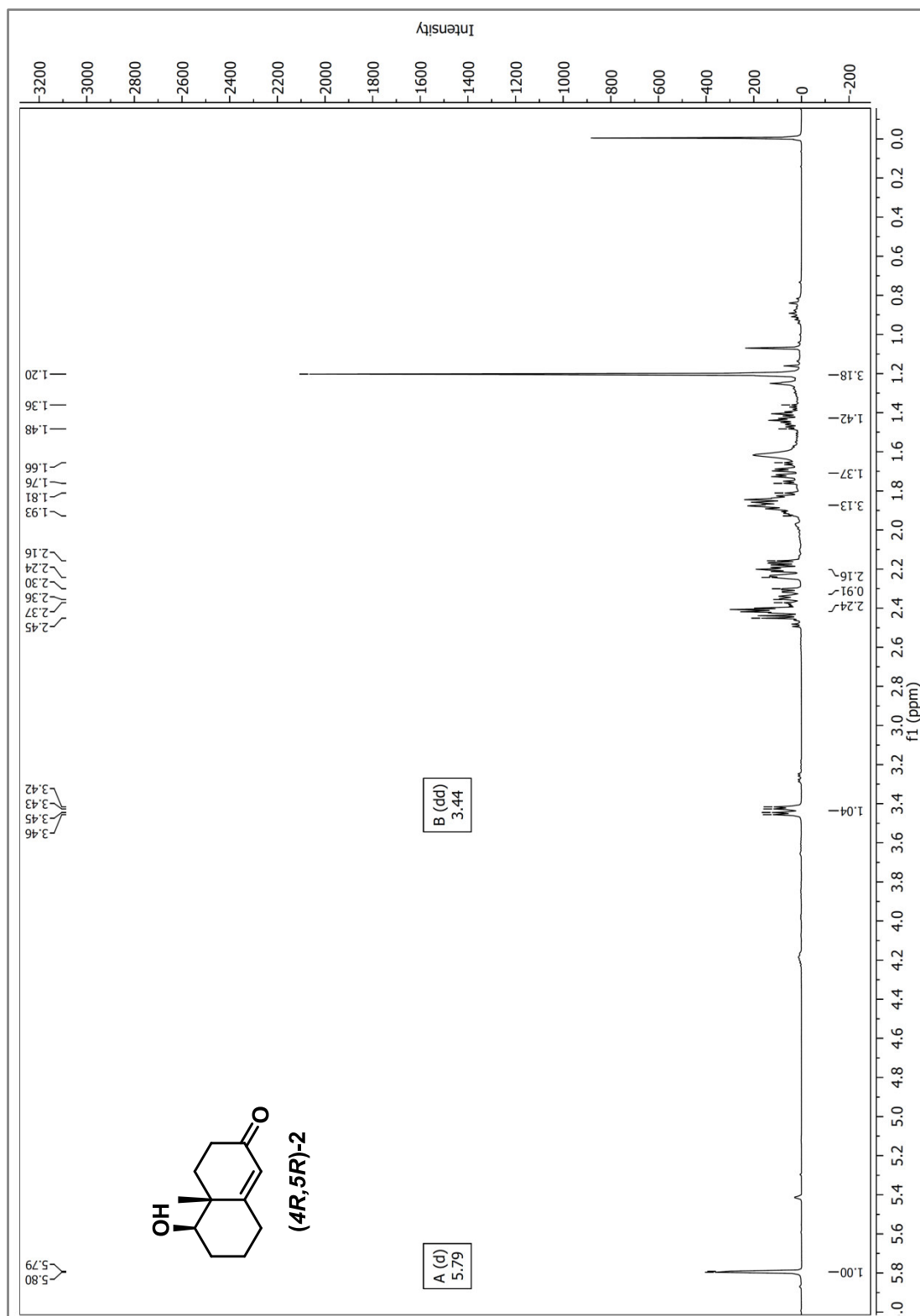


6 Anhang

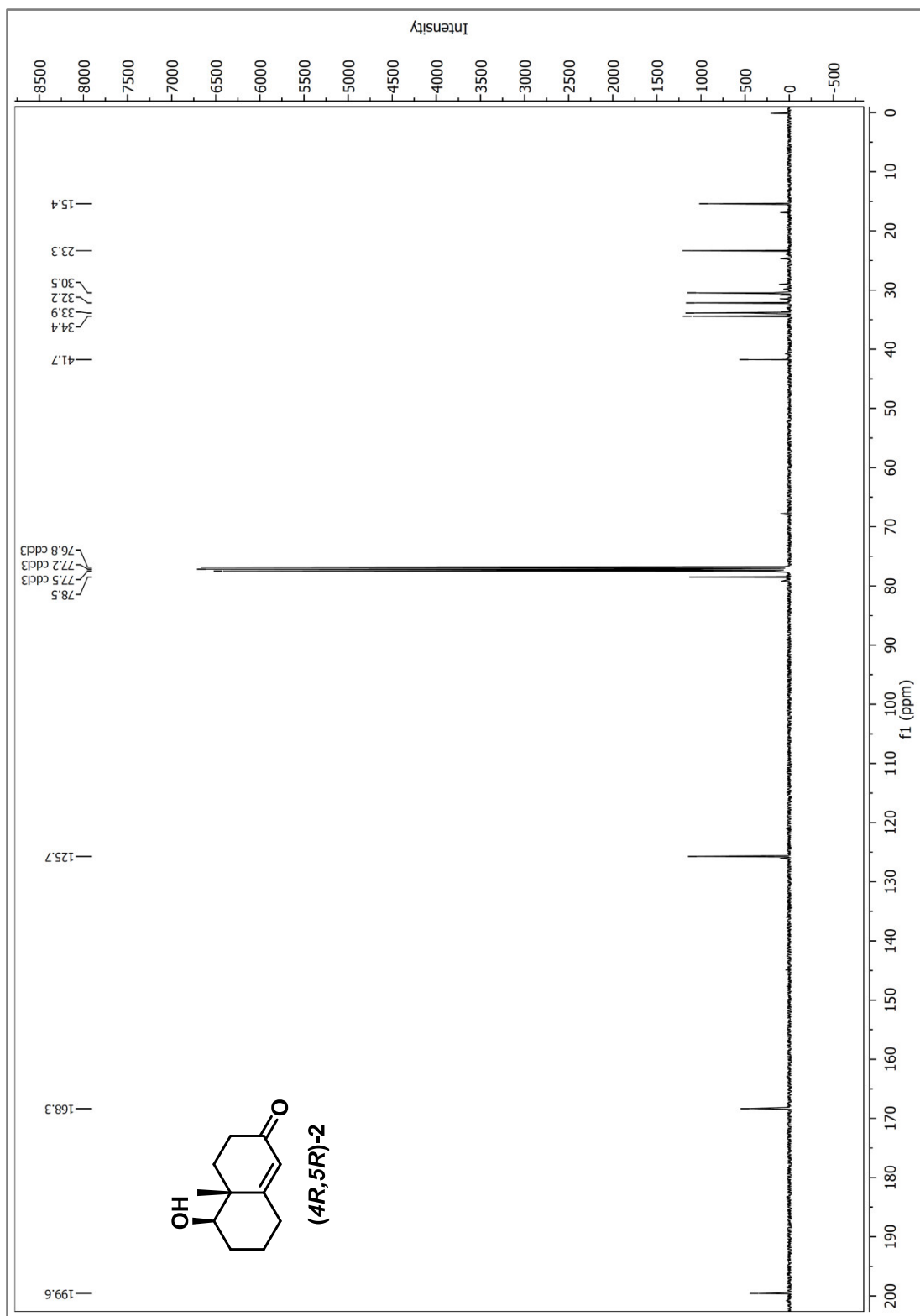


6 Anhang

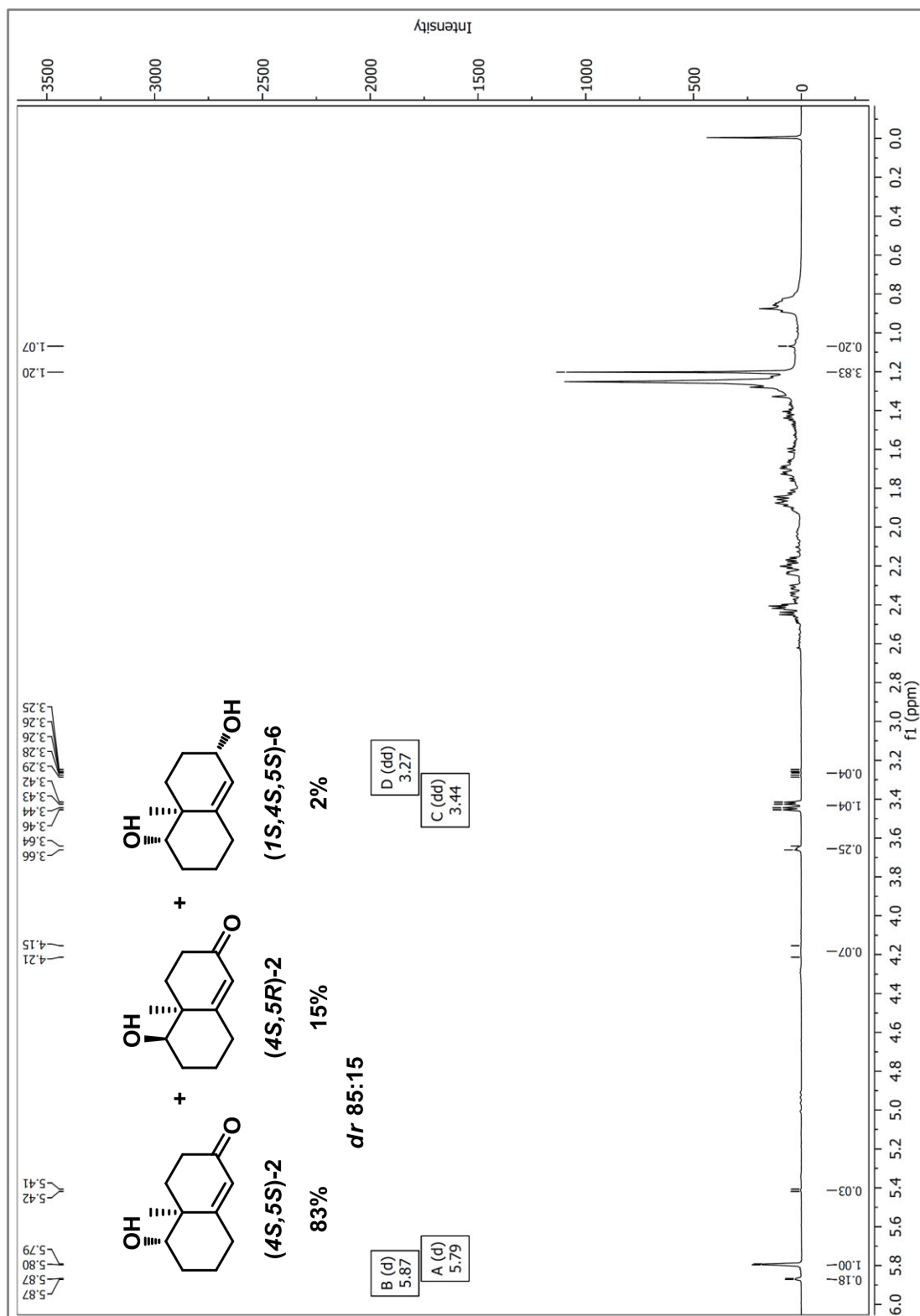
Derivate ausgehend vom Wieland-Miescher-Keton:



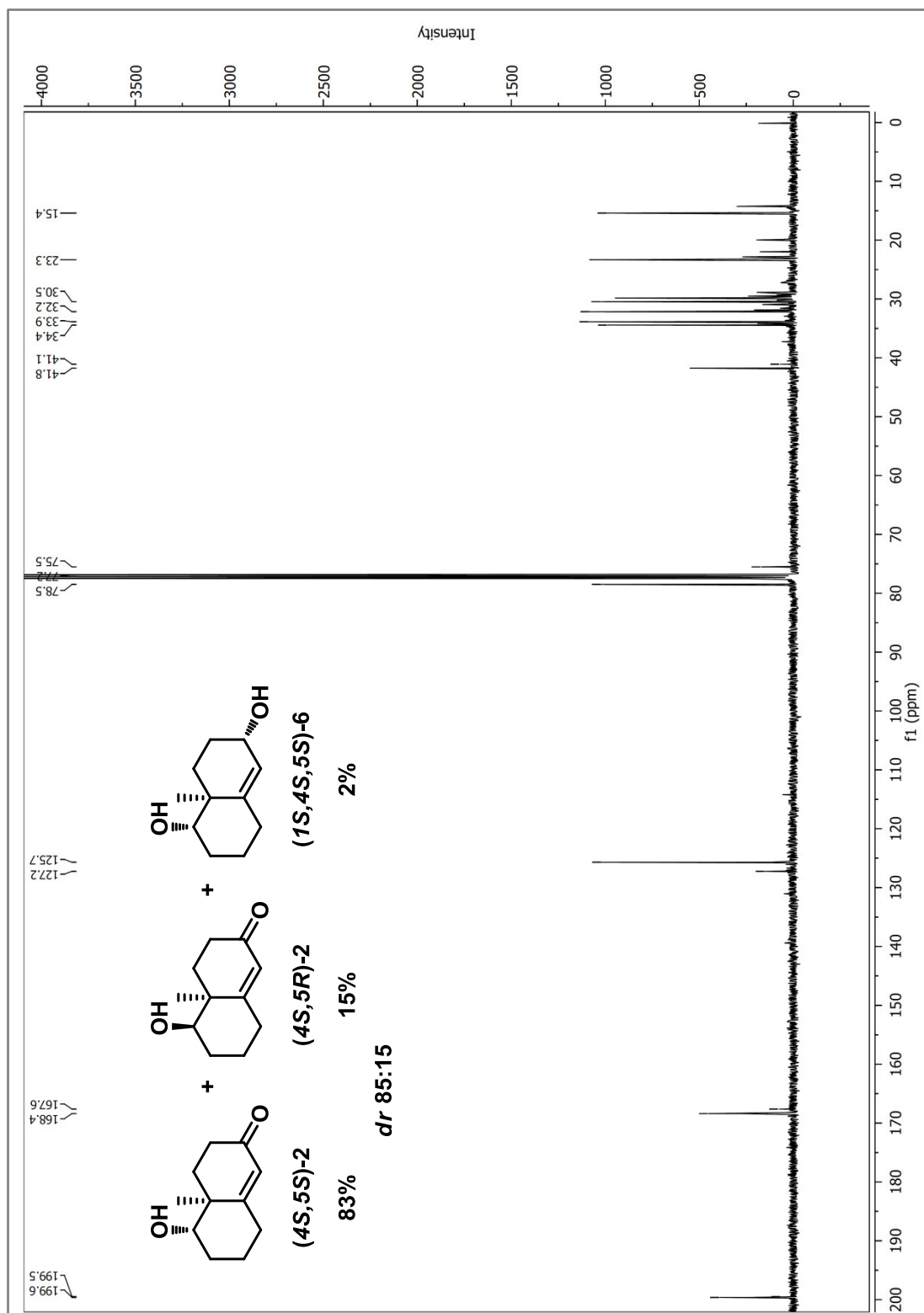
6 Anhang



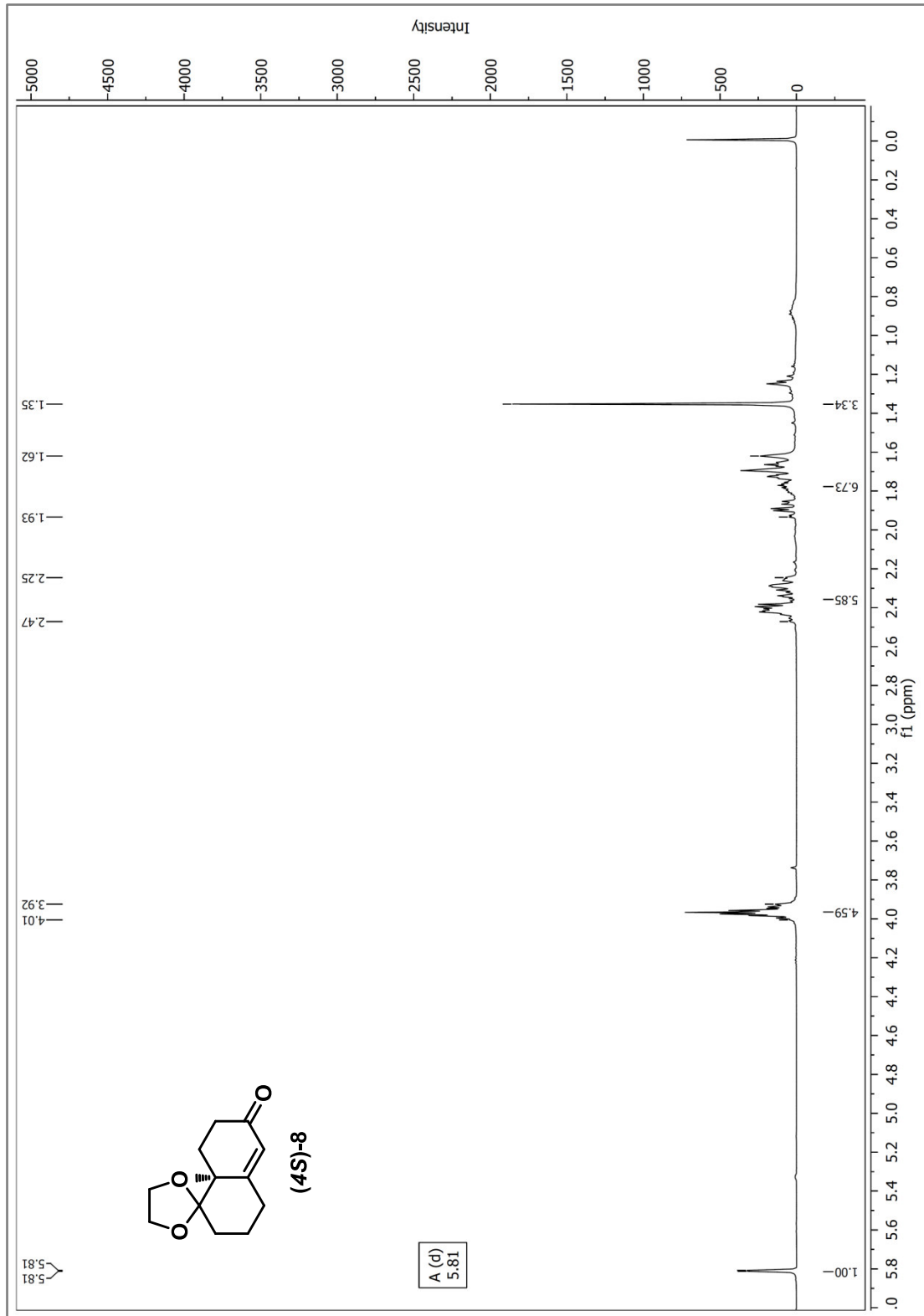
6 Anhang



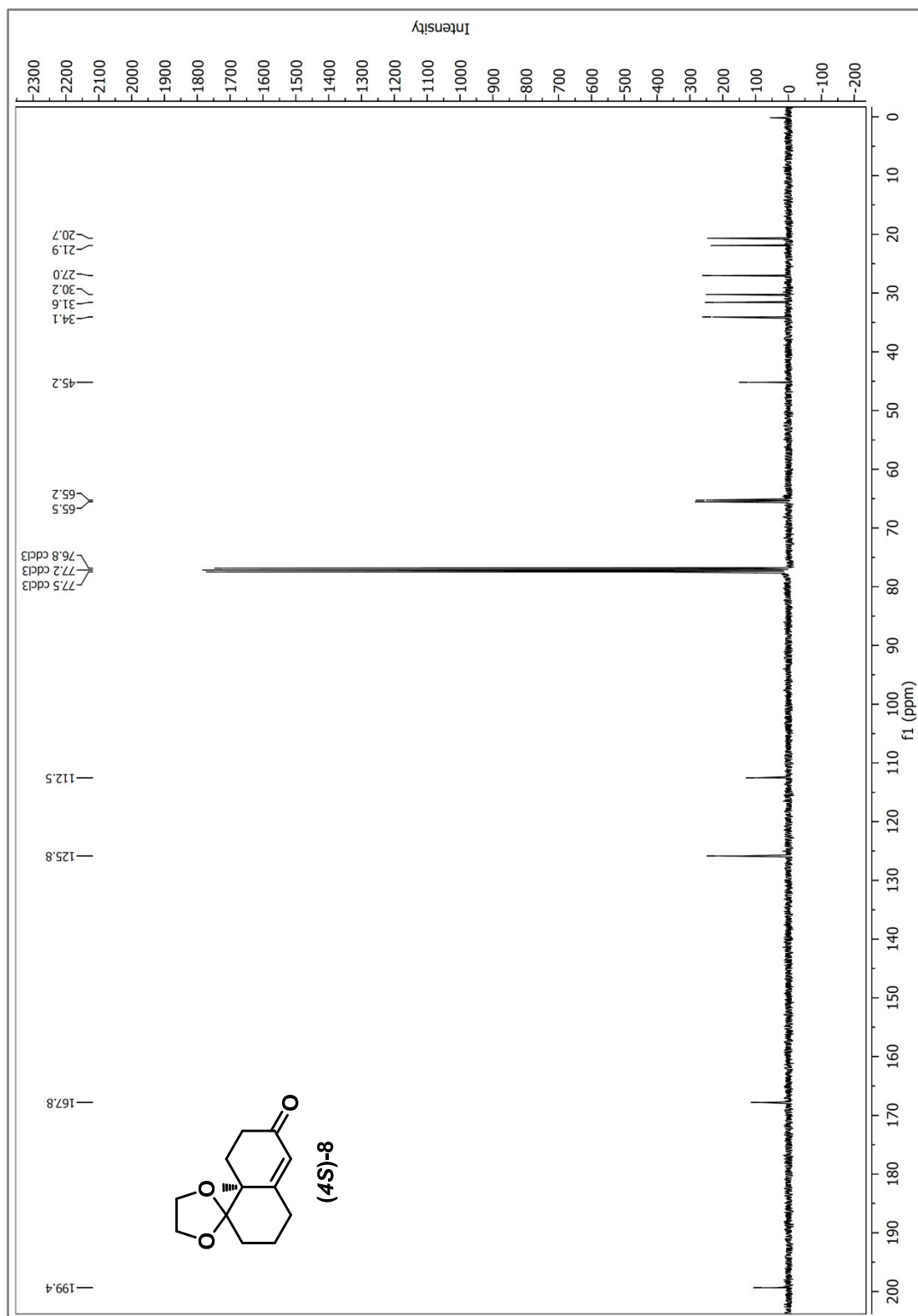
6 Anhang



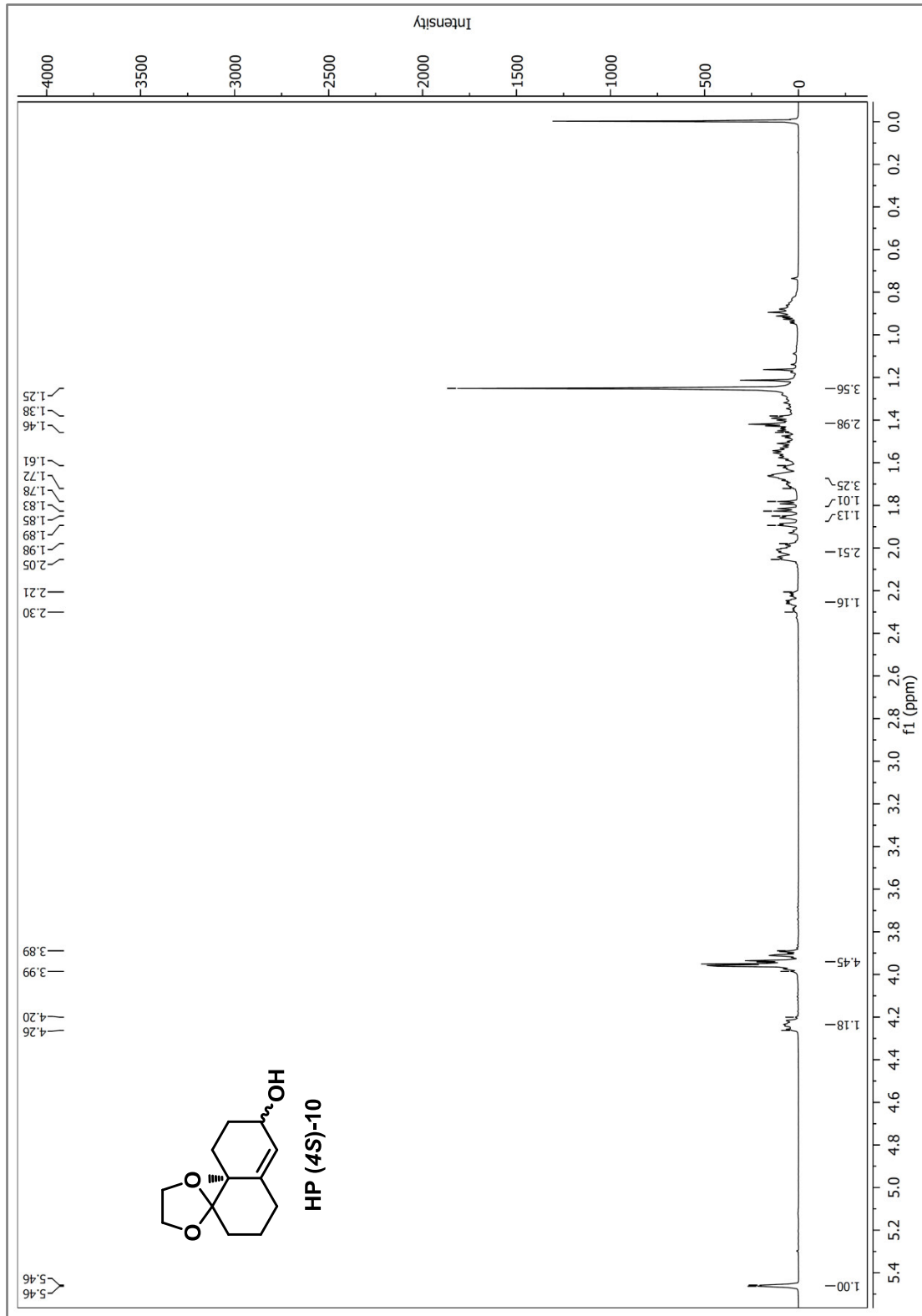
6 Anhang



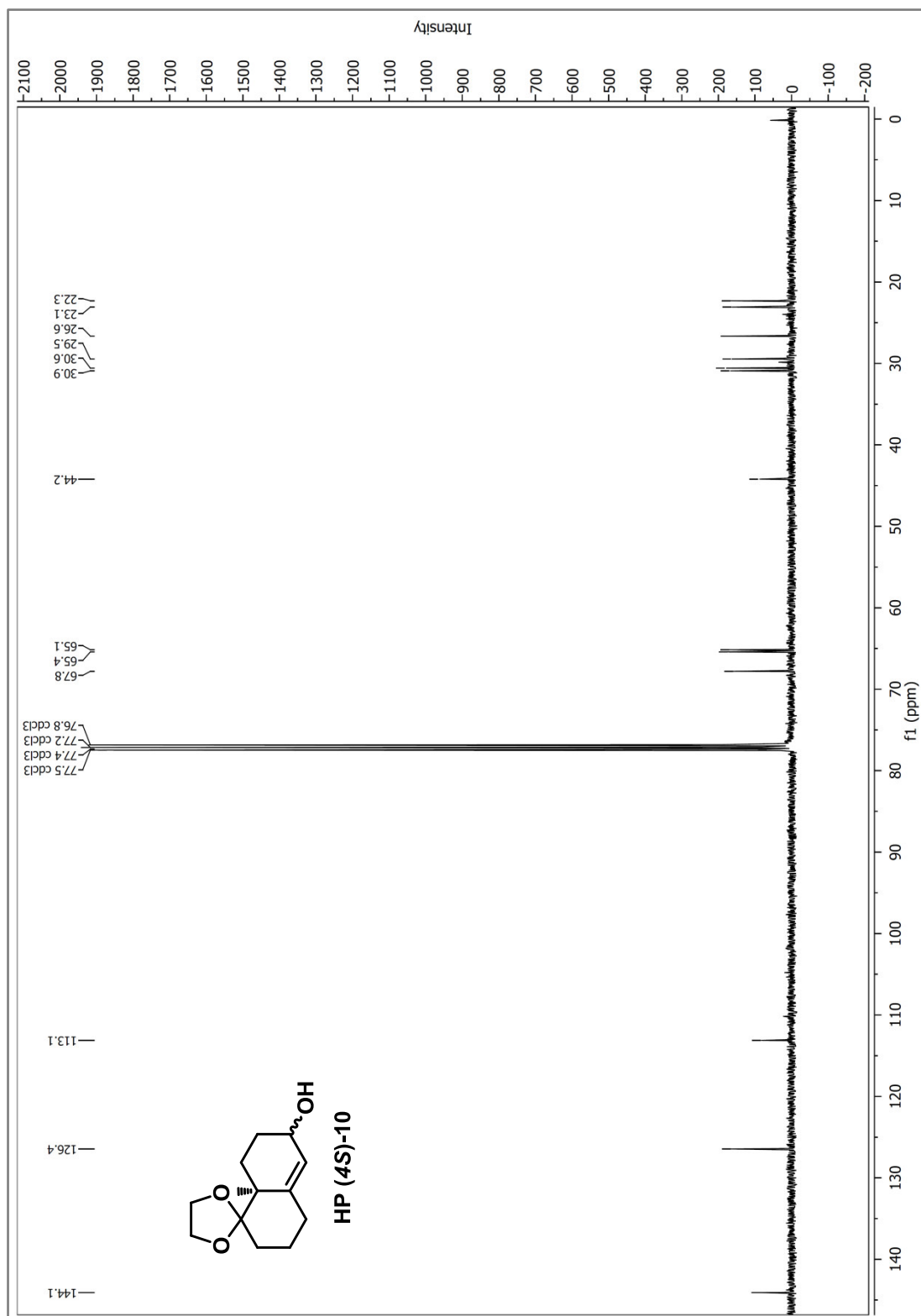
6 Anhang



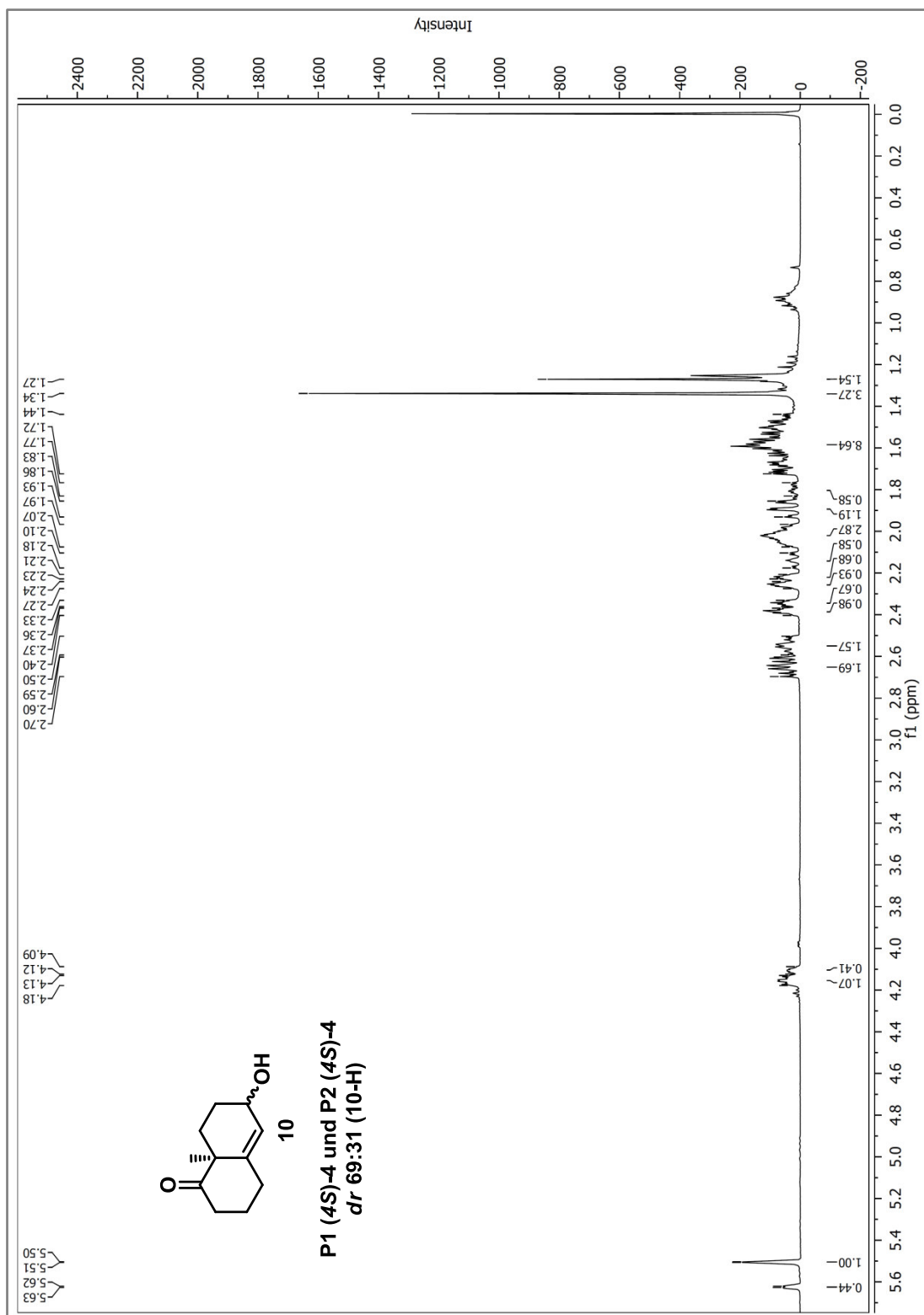
6 Anhang



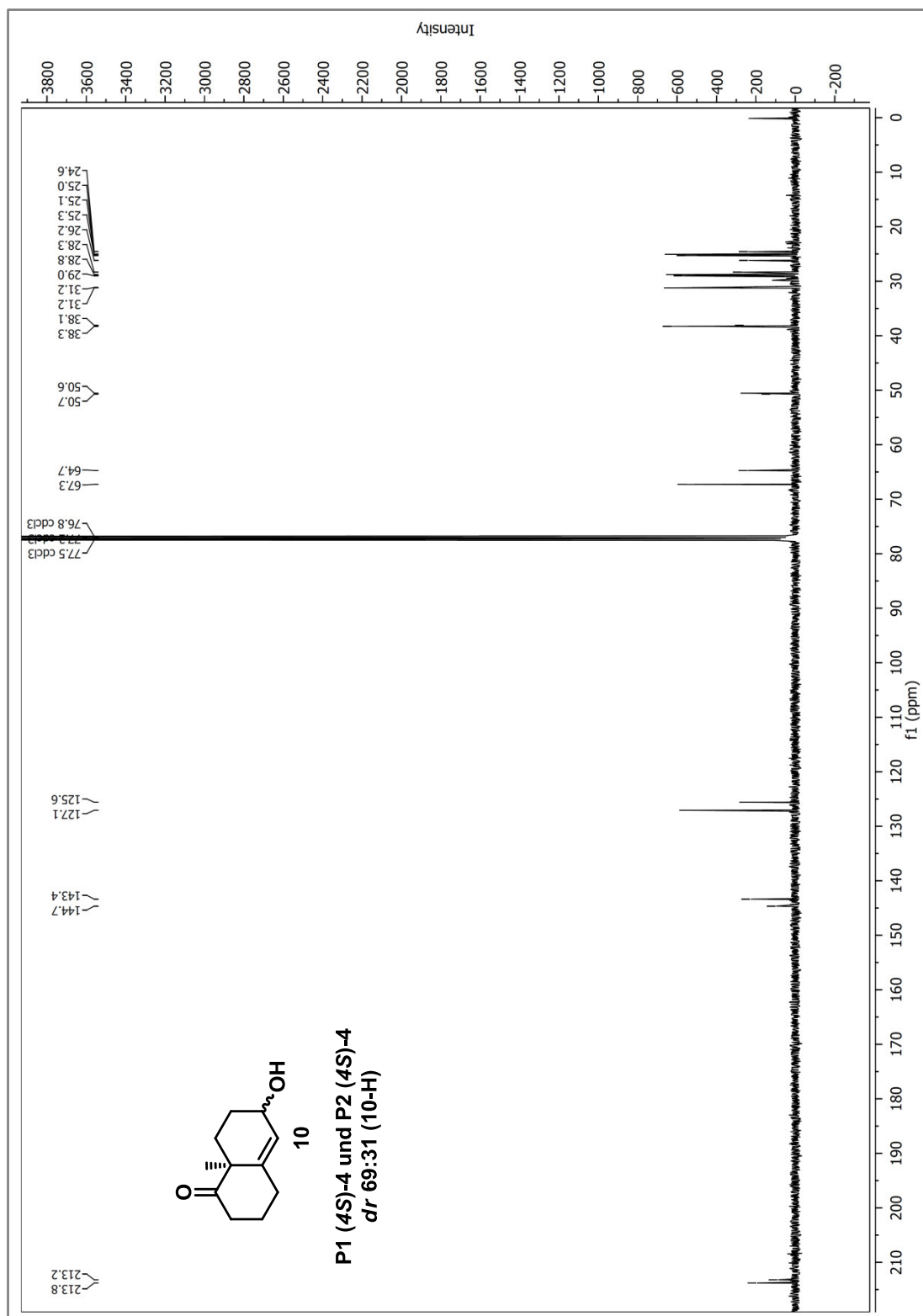
6 Anhang



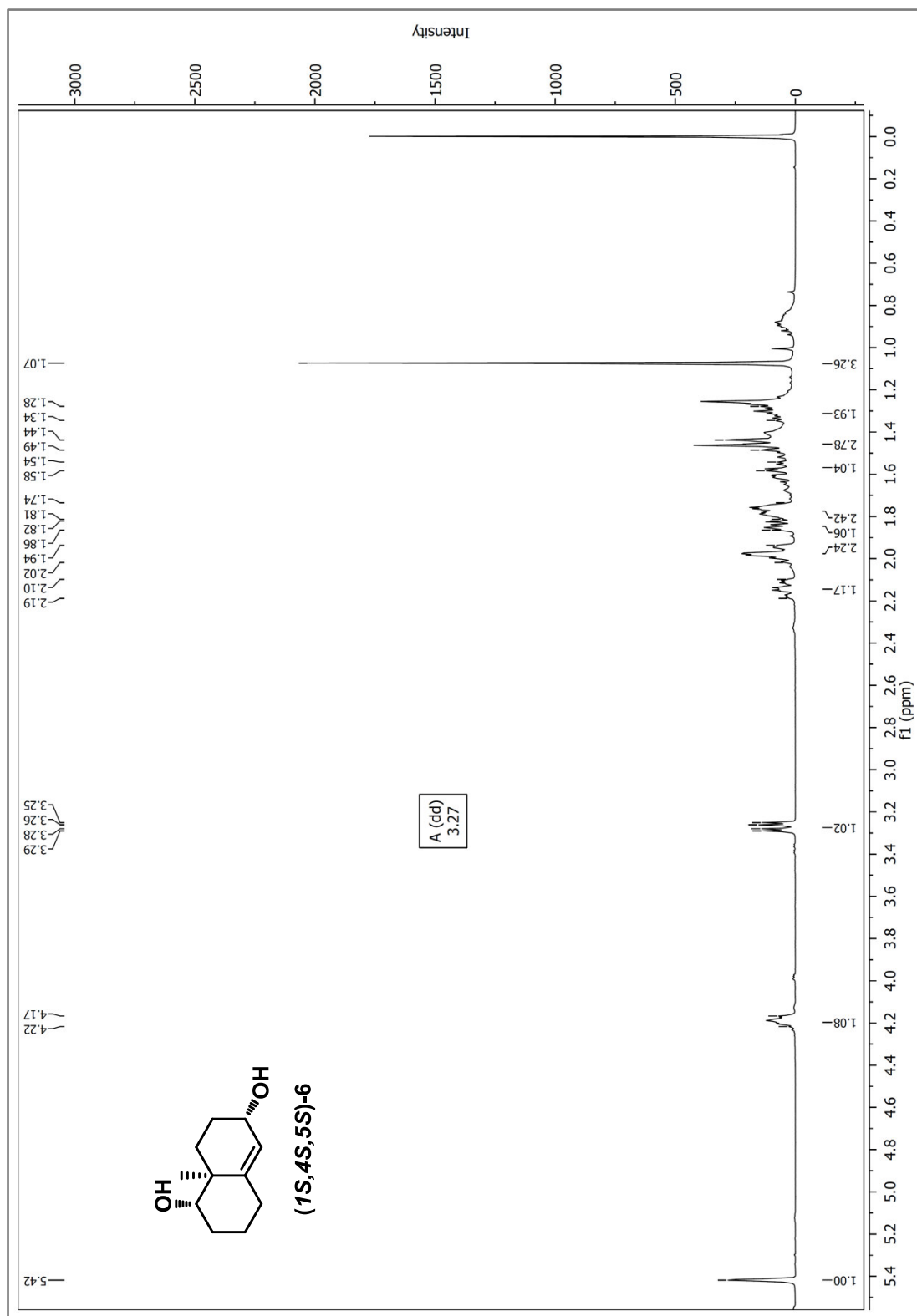
6 Anhang



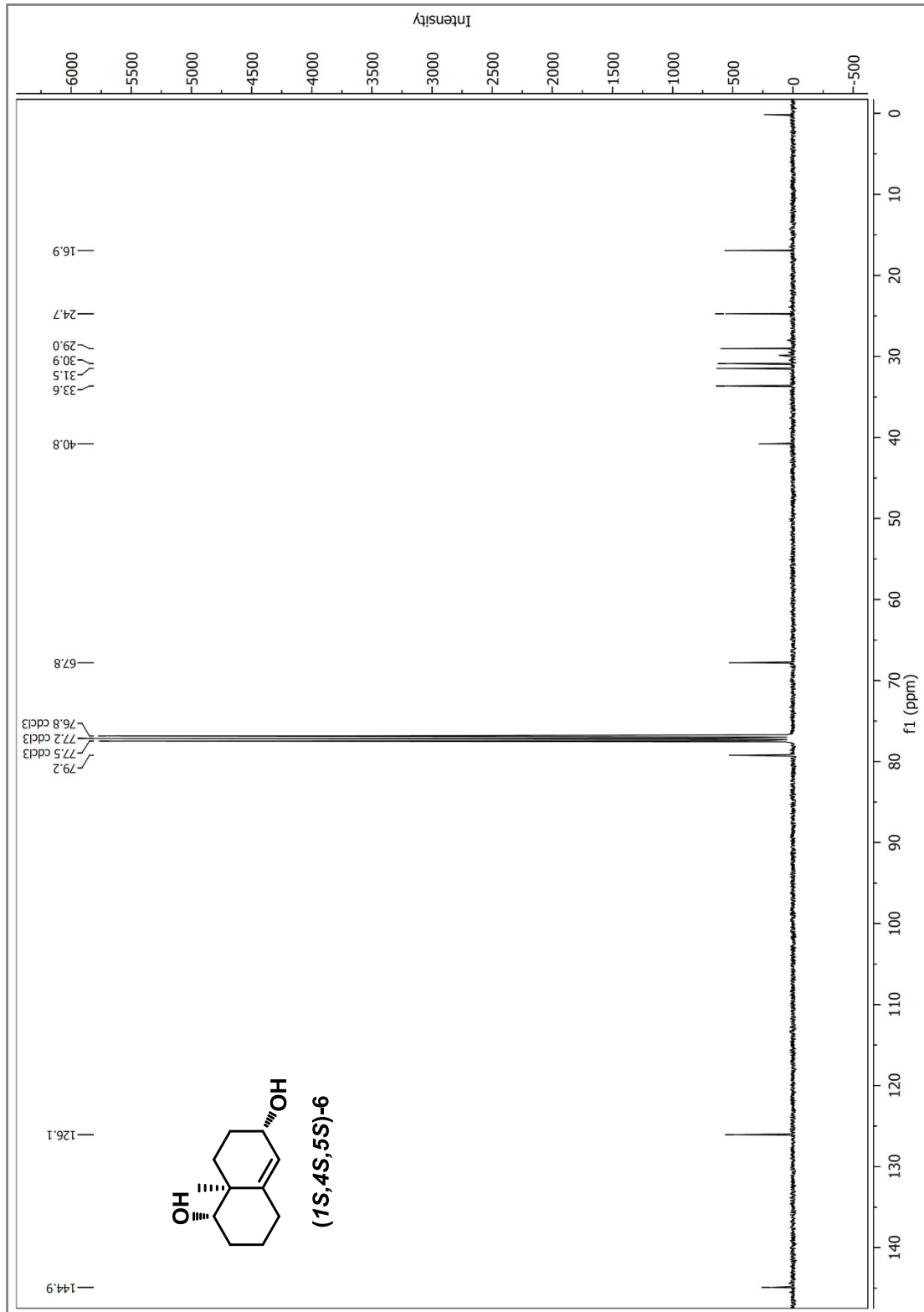
6 Anhang



6 Anhang



6 Anhang



7 Literaturverzeichnis

- Acklin, W.**, Prelog, V., Prieto, A. P. (1958a). Die stereospezifische Reduktion von (\pm) - $\Delta^{4,9}$ -8-Methylhexahydro-indendion-(1,5). *Helv. Chim. Acta* 41, 1416-1424.
- Acklin, W.**, Dütting, D., Prelog, V. (1958b). Reduktion von (\pm) - Δ^4 -9-Methyl-octalindion-(3,8) mit *Aspergillus niger*. *Helv. Chim. Acta* 41, 1424-1427.
- Adams, P. D.**, Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., Zwart, P. H. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66, 213-221.
- Asano, N.**, Nash, R. J., Molyneux, R. J., Fleet, G. W. (2000). Sugar-mimic glycosidase inhibitors: natural occurrence, biological activity and prospects for therapeutic application. *Tetrahedron Asymmetry* 11, 1645–1680.
- Bartholomew, B. A.**, Smith, M. J., Long, M. T., Darcy, P. J., Trudgill, P. W., Hopper, D. J. (1995). Tropine dehydrogenase: purification, some properties and an evaluation of its role in the bacterial metabolism of tropine. *Biochem J.* 307, 603-608.
- Benach, J.**, Filling, C., Oppermann, U. C., Roversi, P., Bricogne, G., Berndt, K. D., Jörnvall, H., Ladenstein, R. (2002). Structure of bacterial $3\beta/17\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase at 1.2 Å resolution: a model for multiple steroid recognition. *Biochemistry* 41, 14659-14668.
- Benach, J.**, Winberg, J. O., Svendsen, J. S., Atrian, S., González-Duarte, R., Ladenstein, R. (2005). Drosophila alcohol dehydrogenase: acetate-enzyme interactions and novel insights into the effects of electrostatics on catalysis. *J Mol Biol.* 345, 579-598.
- Blaschke, G.**, Kraft, H. P., Fickentscher, K., Köhler, F. (1979). Chromatographische Racemattrennung von Thalidomid und teratogene Wirkung der Enantiomere. *Arzneimittelforschung* 29, 1640–1642.
- Bornscheuer, U. T.**, Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C., Robins, K. (2012). Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* 485, 185-194.
- Bradford, M. M.** (1976). Rapid and Sensitive Method for Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254.
- Bradshaw, C. W.**, Hummel, W., Wong, C-H. (1992). *Lactobacillus kefir* Alcohol Dehydrogenase: A Useful Catalyst for Synthesis. *J. Org. Chem.* 57, 1532-1536.
- Brady, T. P.**, Kim, S. H., Wen, K., Kim, C., Theodorakis, E. A. (2005). Norrisolide: Total Synthesis and Related Studies. *Chem. Eur. J.* 11, 7175-7190.
- Bruner, S. D.**, Radeke, H. S., Tallarico, J. A., Snapper, M. L. (1995). Total Synthesis of (-)-Ilimaquinone. *J. Org. Chem.* 60, 1114-1115.

7 Literaturverzeichnis

- Brock, A.**, Herzfeld, T., Paschke, R., Koch, M., Dräger, B. (2006). Brassicaceae contain nortropane alkaloids. *Phytochemistry* 67, 2050-2057.
- Brock, A.**, Brandt, W., Dräger, B. (2008). The functional divergence of short-chain dehydrogenases involved in tropinone reduction. *Plant J.* 54, 388-401.
- Brock, A.** (2008). Gene, Enzyme und Produkte der (Nor)tropanalkaloidbiosynthese in *Cochlearia officinalis* L.. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Cao, L.**, Sun, J., Wang, X., Zhu, R., Shi, H., Hu, Y. (2007). Total synthesis of (-)-elegansidiol by using an abnormal Beckmann fragmentation of Hajos ketone oxime as a key step. *Tetrahedron* 63, 5036-5041.
- Carius, Y.**, Christian, H., Faust, A., Zander, U., Klink, B. U., Kornberger, P., Kohring, G. W., Giffhorn, F., Scheidig, A. J. (2010). Structural insight into substrate differentiation of the sugar-metabolizing enzyme galactitol dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides* D.. *J Biol Chem.* 285, 20006-20014.
- Chen, K.-M.**, Hardtmann, G. E., Prasad, K., Repić, O., Shapiro, M. J. (1987). 1,3-*syn* Diastereoselective Reduction of β -Hydroxyketones utilizing Alkoxydialkylboranes. *Tetrahedron Lett.* 28, 155-158.
- Chen, Z.**, Lu, L., Shirley, M., Lee, W. R., Chang, S. H. (1990). Site-directed mutagenesis of glycine-14 and two "critical" cysteinyl residues in *Drosophila* alcohol dehydrogenase. *Biochemistry* 29, 1112-1118.
- Chen, V. B.**, Arendall, W. B. 3rd, Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson, J. S., Richardson, D. C. (2010). MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66, 12-21.
- Cheatham, T. E.**, Cieplak, P., Kollman, P. A. (1999). A modified version of the Cornell et al. force field with improved sugar pucker phases and helical repeat. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 16, 845-862.
- Ciceri, P.**, Demnitz, F. W. J. (1997). An Efficient and Highly Selective Preparation of the Wieland-Miescher Ketone-9-Ethylene Ketal. *Tetrahedron Lett.* 38, 389-390.
- Clouthier, C. M.**, Pelletier, J. N. (2012). Expanding the organic toolbox: a guide to integrating biocatalysis in synthesis. *Chem Soc Rev.* 41, 1585-1605.
- Corbu, A.**, Gauron, G., Castro, J. M., Dakir, M., Arseniyadis, S. (2007). A Domino-Based Approach toward Stereodefined Heavily Functionalized Cyclohexanes: Synthesis of Iridal's Core Structure. *Org. Lett.* 9, 4745-4748.
- Corey, E. J.**, Bakshi, R. K., Shibata, S. (1987a). Highly Enantioselective Borane Reduction of Ketones Catalyzed by Chiral Oxazaborolidines. Mechanism and Synthetic Implications. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 5551-5553.

- Corey, E. J.**, Bakshi, R. K., Shibata, S., Chen, C.-P., Singh, V. K. (1987b). A Stable and Easily Prepared Catalyst for the Enantioselective Reduction of Ketones. Applications to Multi-step Syntheses. *J. Am. Chem. Soc.* 109, 7925-1926.
- Corey, E. J.**, Shibata, S., Bakshi, R. K. (1988). An Efficient and Catalytically Enantioselective Route to (*S*)-(-)-Phenyloxirane. *J. Org. Chem.* 53, 2861-2863.
- Cornell, W. D.**, Cieplak, P., Bayly, C. I., Gould, I. R., Merz, Jr., K. M., Ferguson, D. M., Spellmeyer, D. C., Fox, T., Caldwell, J. W., Kollman, P. A. (1995). A Second Generation Force Field for the Simulation of Proteins, Nucleic Acids, and Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 5179-5197.
- Danishefsky, S. J.**, Masters, J. J., Young, W. B., Link, J. T., Snyder, L. B., Magee, T. V., Jung, D. K., Isaacs, R. C. A., Bornmann, W. G., Alaimo, C. A., Coburn, C. A., Di Grandi, M. J. (1996). Total Synthesis of Baccatin III and Taxol. *J. Am. Chem. Soc.* 118, 2843-2859.
- Dräger, B.**, Hashimoto, T., Yamada, Y. (1988). Purification and Characterization of Pseudotropine Forming Tropinone Reductase from *Hyocyamus niger* Root Cultures. *Agric. Biol. Chem.* 52, 2663-2667.
- Dräger, B. and Schaal, A.** (1994). Tropinone Reduction in *Atropa Belladonna* Root Cultures. *Phytochem.* 35, 1441-1447.
- Dräger, B.** (2006). Tropinone reductases, enzymes at the branch point of tropane alkaloid metabolism. *Phytochemistry* 67, 327-337.
- Eder, U.**, Sauer, G., Wiechert, R. (1971). New Type of Asymmetric Cyclization to Optically Active Steroid CD Partial Structures. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 10, 496-497.
- Emsley, P.**, Lohkamp, B., Scott, W. G., Cowtan, K. (2010). Features and development of Coot. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66, 486-501.
- Ensor, C. M.**, Yang, J. Y., Okita, R. T., Tai, H. H. (1990). Cloning and sequence analysis of the cDNA for human placental NAD(+)-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase. *J Biol Chem.* 265, 14888-14891.
- Filling, C.**, Berndt, K. D., Benach, J., Knapp, S., Prozorovski, T., Nordling, E., Ladenstein, R., Jörnvall, H., Oppermann, U. (2002). Critical residues for structure and catalysis in short-chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem.* 277, 25677-25684.
- Fischer, J.** (2015). Homology modelling, virtual screening and evolutionary analyses of plant enzymes metabolising putrescine. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Fomitcheva, J.**, Baker, M. E., Anderson, E., Lee, G. Y., Aziz, N. (1998). Characterization of Ke 6, a new 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and its expression in gonadal tissues. *J Biol Chem.* 273, 22664-22671.

- Fuhshuku, K.**, Funa, N., Akeboshi, T., Ohta, H., Hosomi, H., Ohba, S., Sugai, T. (2000). Access to Wieland-Miescher ketone in an enantiomerically pure form by a kinetic resolution with yeast-mediated reduction. *J Org Chem.* 65, 129-135.
- Fuhshuku, K.**, Tomita, M., Sugai, T. (2003). Enantiomerically Pure Octahydronaphthalenone and Octahydroindenone: Elaboration of the Substrate Overcame the Specificity of Yeast-Mediated Reduction. *Adv Synth Catal.* 345, 766-774.
- Ghosh, D.**, Weeks, C. M., Grochulski, P., Duax, W. L., Erman, M., Rimsay, R. L., Orr, J. C., (1991). 3-Dimensional structure of holo $3\alpha,20\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase – a member of a short-chain dehydrogenase family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88, 10064-10068.
- Ghosh, D.**, Wawrzak, Z., Weeks, C. M., Duax, W. L., Erman, M. (1994). The refined three-dimensional structure of $3\alpha,20\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and possible roles of the residues conserved in short-chain dehydrogenases. *Structure* 2, 629-640.
- Ghosh, D.**, Sawicki, M., Pletnev, V., Erman, M., Ohno, S., Nakajin, S., Duax, W. L. (2001). Porcine carbonyl reductase - Structural basis for a functional monomer in short chain dehydrogenases/reductases. *J Biol Chem.* 276, 18457-18463.
- González-Guzmán, M.**, Apostolova, N., Bellés, J. M., Barrero, J. M., Piqueras, P., Ponce, M. R., Micol, J. L., Serrano, R., Rodríguez, P. L. (2002). The short-chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin to abscisic aldehyde. *Plant Cell.* 14, 1833-1846.
- Gottlieb, H. E.**, Kotlyra, V., Nudelman, A. (1997). NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* 62, 7512-7515.
- Guo, K.**, Lukacik, P., Papagrigoriou, E., Meier, M., Lee, W. H., Adamski, J., Oppermann, U. (2006). Characterization of human DHRS6, an orphan short chain dehydrogenase/reductase enzyme: a novel, cytosolic type 2 R- β -hydroxybutyrate dehydrogenase. *J Biol Chem.* 281, 10291-10297.
- Hajos, Z. G.**, Parrish, D. R. (1974). Asymmetric Synthesis of Bicyclic Intermediates of Natural Product Chemistry. *J. Org. Chem.* 39, 1615-1621.
- Halgren, T. A.** (1996). Merck Molecular Force Field. I. Basis, Form, Scope, Parameterization, and Performance of MMFF94. *J Comput Chem.* 17, 490-519.
- Harada, N.**, Sugioka, T., Uda, H., Kuriki, T. (1990). Efficient Preparation of Optically Pure Wieland-Miescher Ketone and Confirmation of Its Absolute Stereochemistry by the CD Exciton Chirality Method. *Synthesis* 53-56.
- Hashimoto, T.**, Nakajima, K., Ongena, G., Yamada, Y. (1992). Two Tropinone Reductases with Distinct Stereospecificities from Cultured Roots of *Hyoscyamus niger*. *Plant Physiol.* 100, 836-845.
- Hill, A. V.** (1910). The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J Physiol.* 40, iv-vii.

- Hoelsch, K.**, Sührer, I., Heusel, M., Weuster-Botz, D. (2013). Engineering of formate dehydrogenase: synergistic effect of mutations affecting cofactor specificity and chemical stability. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97, 2473-2481.
- Hog, D. T.**, Huber, F. M. E., Mayer, P., Trauner D. (2014). The Total Synthesis of (-)-Nitidasin. *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 8513-8517.
- Hioki, H.**, Hashimoto, T., Kodama, M. (2000). Efficient kinetic resolution of (\pm)-4-methyl-Hajos-Parrish ketone by baker's yeast reduction. *Tetrahedron Asymmetry* 11, 829-834.
- Honda, T.**, Favalaro Jr., F. G., Janosik, T., Honda, Y., Suh, N., Sporn M. B., Gribble, G. W. (2003). Efficient synthesis of (-)- and (+)-tricyclic compounds with enone functionalities in rings A and C. A novel class of orally active anti-inflammatory and cancer chemopreventive agents. *Org. Biomol. Chem.* 1, 4384-4391.
- Huang, Y. W.**, Pineau, I., Chang, H. J., Azzi, A., Bellemare, V., Laberge, S., Lin, S. X. (2001). Critical residues for the specificity of cofactors and substrates in human estrogenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1: variants designed from the three-dimensional structure of the enzyme. *Mol Endocrinol.* 15, 2010-2020.
- Ihara, M.**, Toyota, M., Fukumoto, K., Kametani, T. (1986). An Enantioselective Total Synthesis of (+)-Atisirene by Intramolecular Double Michael Reaction. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 2151-2161.
- Janeczko, T.**, Dmochowska-Gładysz, J., Kostrzewa-Susłow E., (2010). Chemoenzymatic resolution of racemic Wieland-Miescher and Hajos-Parrish ketones. *World J Microbiol Biotechnol.* 26, 2047-2051.
- Johannes, T. W.**, Woodyer, R. D., Zhao, H. (2007). Efficient regeneration of NADPH using an engineered phosphite dehydrogenase. *Biotechnol Bioeng.* 96, 18-26.
- Jones, G.**, Willett, P., Glen, R. C., Leach, A. R., Taylor, R. (1997). Development and validation of a genetic algorithm for flexible docking. *J Mol Biol.* 267, 727-748.
- Kabsch, W.** (2010). Integration, scaling, space-group assignment and post-refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 66, 133-144.
- Kallberg, Y.**, Oppermann, U., Jörnvall, H., Persson, B. (2002). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDRs) - Coenzyme-based functional assignments in completed genomes. *Eur J Biochem.* 269, 4409-4417.
- Kallberg, Y.**, Oppermann, U., Persson, B. (2010). Classification of the short-chain dehydrogenase/reductase superfamily using hidden Markov models. *FEBS J.* 277, 2375-2386.
- Katzberg, M.**, Skorupa-Parachin, N., Gorwa-Grauslund, M. F., Bertau, M. (2010). Engineering cofactor preference of ketone reducing biocatalysts: A mutagenesis study on a γ -diketone reductase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* serving as an example. *Int J Mol Sci.* 11, 1735-1758.

- Kavanagh, K.**, Jörnvall, H., Persson, B., Oppermann, U. (2008). The SDR superfamily: functional and structural diversity within a family of metabolic and regulatory enzymes. *Cell Mol Life Sci.* 65, 3895-3906.
- Koelen, K. J. and Gross, G. G.** (1982). Partial purification and properties of tropine dehydrogenase from root cultures of *Datura stramonium*. *Planta Med.* 44, 227-230.
- Kristan, K.**, Stojan, J., Möller, G., Adamski, J., Rizner, T. L. (2005). Coenzyme specificity in fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol Cell Endocrinol.* 241, 80-87.
- Kristan, K.**, Stojan, J., Adamski, J., Lanisnik Rizner, T. (2007). Rational design of novel mutants of fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biotechnol.* 129, 123-130.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of Structural Proteins During Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature* 227, 680-&.
- Lerchner, A.**, Jarasch, A., Meining, W., Schiefner, A., Skerra, A. (2013). Crystallographic analysis and structure-guided engineering of NADPH-dependent *Ralstonia sp.* alcohol dehydrogenase toward NADH cosubstrate specificity. *Biotechnol Bioeng.* 110, 2803-2814.
- Liang, J.**, Lalonde, J., Borup, B., Mitchell, V., Mundorff, E., Trinh, N., Kochrekar D. A., Nair Cherat, R., Ganesh Pai, G. (2010). Development of a biocatalytic process as an alternative to the (-)-DIP-Cl-mediated asymmetric reduction of a key intermediate of montelukast. *Org. Process Res. Dev.* 14, 193-198.
- Liebisch, H. W.**, Bernasch, H., Schütte, H. R. (1973). Biosynthesis of tropane alkaloids. 12. Biosynthesis of cochlearine. *Z. Chem.* 13, 372-373.
- Lu, Y. S.**, Peng, X. S. (2011). A concise construction of the chlorahololide heptacyclic core. *Org Lett.* 13, 2940-2943.
- Lu, J.**, Aguilar, A., Zou, B., Bao, W., Koldas, S., Shi, A., Desper, J., Wangemann, P., Xie, X. S., Hua, D. H. (2015). Chemical synthesis of tetracyclic terpenes and evaluation of antagonistic activity on endothelin-A receptors and voltage-gated calcium channels. *Bioorg Med Chem.* 23, 5985-5998.
- Ma, K.**, Zhang, C., Liu, M., Chu, Y., Zhou, L., Hu, C., Ye, D. (2010a). First total synthesis of (+)-Carainterol A. *Tetrahedron Lett.* 51, 1870-1872.
- Ma, S. K.**, Gruber, J., Davis, C., Newman, L., Gray, D., Wang, A., Grate, J., Huisman, G. W., Sheldon, R. A. (2010b). A green-by-design biocatalytic process for atorvastatin intermediate. *Green Chem.* 12, 81-86.
- McCoy, A. J.**, Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr.* 40, 658-674.
- Mehta, G.**, Srinivasarao Yaragorla, S. (2013). A concise, enantiospecific, Hajos-Parrish ketone based model approach toward the tetracyclic core of complex shiartane-type nortriterpenoid natural products. *Tetrahedron Lett.* 54, 549-552.

- Michaelis, L. und Menten, M. L. (1913).** Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem. Z.* 49, 333-369.
- Micheli, R. A., Hajos, Z. G., Cohen, N., Parrish, D. R., Portland, L. A., Sciamanna, W., Scott, M. A., Wehrli, P. A. (1975).** Total syntheses of optically active 19-norsteroids. (+)-Estr-4-ene-3,17-dione and (+)-13 β -Ethylgon-4-ene-3,17-dione. *J Org Chem.* 40, 675-681.
- Morikawa, S., Nakai, T., Yasohara, Y., Nanba, H., Kizaki, N., Hasegawa, J. (2005).** Highly active mutants of carbonyl reductase S1 with inverted coenzyme specificity and production of optically active alcohols. *Biosci Biotechnol Biochem.* 69, 544-552.
- Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y. (1994).** Opposite stereospecificity of two tropinone reductases is conferred by the substrate-binding sites. *J Biol Chem.* 269, 11695-11698.
- Nakajima, K., Yamashita, A., Akama, H., Nakatsu, T., Kato, H., Hashimoto, T., Oda, J., Yamada, Y. (1998).** Crystal structures of two tropinone reductases: different reaction stereospecificities in the same protein fold. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 4876-4881.
- Nakanishi, M., Matsuura, K., Kaibe, H., Tanaka, N., Nonaka, T., Mitsui, Y., Hara, A. (1997).** Switch of coenzyme specificity of mouse lung carbonyl reductase by substitution of threonine 38 with aspartic acid. *J Biol Chem.* 272, 2218-2222.
- Navarro-Quezada, A. R. (2007).** Molecular evolution of tropinone-reductase-like and tau GST genes duplicated in tandem in Brassicaceae. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Okamoto, S., Yu, F., Harada, H., Okajima, T., Hattan, J., Misawa, N., Utsumi, R. (2011).** A short-chain dehydrogenase involved in terpene metabolism from *Zingiber zerumbet*. *FEBS J.* 278, 2892-2900.
- Oppermann, U. C., Maser, E. (1996).** Characterization of a 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from the gram-negative bacterium *Comamonas testosteroni*. *Eur J Biochem.* 241, 744-749.
- Oppermann, U., Filling, C., Hult, M., Shafqat, N., Wu, X., Lindh, M., Shafqat, J., Nordling, E., Kallberg, Y., Persson, B., Jörnvall, H. (2002).** Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR): the 2002 update. *Chem Biol Interact.* 143-144, 247-253.
- Otagiri, M., Kurisu, G., Ui, S., Takusagawa, Y., Ohkuma, M., Kudo, T., Kusunoki, M. (2001).** Crystal structure of meso-2,3-butanediol dehydrogenase in a complex with NAD⁺ and inhibitor mercaptoethanol at 1.7 Å resolution for understanding of chiral substrate recognition mechanisms. *J Biochem.* 129, 205-208.
- Patel, R. N., Chu, L., Mueller R. (2003).** Diastereoselective microbial reduction of (*S*)-[3-chloro-2-oxo-1-(phenylmethyl)propyl]carbamic acid, 1,1-dimethylethyl ester. *Tetrahedron Asymmetry* 14, 3105-3109.
- Peng, X. S., Wong, H. N. (2006).** Total synthesis of (\pm)-pallavicinin and (\pm)-neopallavicinin. *Chem Asian J.* 1, 111-120.

7 Literaturverzeichnis

- Persson, B.**, Kallberg, Y., Bray, J. E., Bruford, E., Dellaporta, S. L., Favia, A. D., Duarte, R. G., Jörnvall, H., Kavanagh, K. L., Kedishvili, N., Kisiela, M., Maserk, E., Mindnich, R., Orchard, S., Penning, T. M., Thornton, J. M., Adamski, J., Oppermann, U. (2009). The SDR (shortchain dehydrogenase/reductase and related enzymes) nomenclature initiative. *Chem Biol Interact.* 178, 94-98.
- Persson, B.**, Kallberg, Y. (2013). Classification and nomenclature of the superfamily of short chain dehydrogenases/reductases (SDRs). *Chem Biol Interact.* 202, 111-115.
- Portsteffen, A.**, Dräger, B., Nahrstedt, A. (1994). The reduction of tropinone in *Datura stramonium* root cultures by two specific reductases. *Phytochemistry* 37, 391-400.
- Powell, A. J.**, Read, J. A., Banfield, M. J., Gunn-Moore, F., Yan, S. D., Lustbader, J., Stern, A. R., Stern, D. M., Brady, R. L. (2000). Recognition of structurally diverse substrates by type II 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADH II)/amyloid- β binding alcohol dehydrogenase (ABAD). *J Mol Biol.* 303, 311-327.
- Prelog, V.**, Acklin, W. (1956). Die stereospezifische Reduktion von (\pm) - Δ^4 -9-Methyloctalindion-(3,8). *Helv. Chim. Acta* 39, 748 -757.
- Reinhardt, N.**, Fischer, J., Coppi, R., Blum, E., Brandt, W., Dräger, B., (2014). Substrate flexibility and reaction specificity of tropinone reductase-like short-chain dehydrogenases. *Bioorg Chem.* 53, 37-49.
- Reinhardt, N.** (2014). Untersuchung der katalytischen Eigenschaften Tropinonreduktase-ähnlicher kurzkettiger Dehydrogenasen/Reduktasen aus Brassicaceen. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Ringer, K. L.**, Davis, E. M., Croteau, R. (2005). Monoterpene metabolism. Cloning, expression, and characterization of (-)-isopiperitenol/(-)-carveol dehydrogenase of peppermint and spearmint. *Plant Physiol.* 137, 863-872.
- Rossmann, M. G.**, Moras, D., Olsen, K.W. (1974). Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature* 250, 194-199.
- Sahni-Arya, B.**, Flynn, M. J., Bergeron, L., Salyan, M. E. K., Pedicord, D. L., Golla, R., Ma, Z. P., Wang, H. X., Seethala, R., Wu, S. C., Li, J. J., Nayeem, A., Gates, C., Hamann, L. G., Gordon, D. A., Blat, Y. (2007). Cofactor-specific modulation of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase 1 inhibitor potency. *BBA-Proteins and Proteomics* 1774, 1184-1191.
- Schauder, S.**, Schneider, K. H., Giffhorn, F. (1995). Polyol metabolism of *Rhodobacter sphaeroides*: biochemical characterization of a short-chain sorbitol dehydrogenase. *Micobiology* 141, 1857-1863.
- Schlieben, N. H.**, Niefind, K., Müller, J., Riebel, B., Hummel, W., Schomburg, D. (2005). Atomic resolution structures of R-specific alcohol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis* provide the structural bases of its substrate and cosubstrate specificity. *J Mol Biol.* 349, 801-813.

- Schippers, J. H.**, Nunes-Nesi, A., Apetrei, R., Hille, J., Fernie, A. R., Dijkwel, P. P. (2008). The Arabidopsis onset of leaf death5 mutation of quinolinate synthase affects nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis and causes early ageing. *Plant Cell*. 20, 2909-2925.
- Schuck, P.** (2002). Size-distribution analysis of macromolecules by sedimentation velocity ultracentrifugation and lamm equation modeling. *Biophys J*. 78, 1606-1619.
- Schuster, T. M. and Toedt, J. M.** (1996). New revolutions in the evolution of analytical ultracentrifugation. *Curr Opin Struct Biol*. 6, 650-658.
- Shafqat, N.**, Marschall, H. U., Filling, C., Nordling, E., Wu, X. Q., Björk, L., Thyberg, J., Mårtensson, E., Salim, S., Jörnvall, H., Oppermann, U. (2003). Expanded substrate screenings of human and Drosophila type 10 17 β -hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) reveal multiple specificities in bile acid and steroid hormone metabolism: characterization of multifunctional 3 α /7 α /17 β /20 β /21-HSD. *Biochem J*. 376, 49-60.
- Stubbing, L. A.**, Lott, J. S., Dawes, S. S., Furkert, D. P., Brimble, M. A. (2015). Synthesis of DOHNAA, a *Mycobacterium tuberculosis* Cholesterol CD Ring Catabolite and FadD3 Substrate. *Eur. J. Org. Chem*. 6075–6083.
- Sugimura T.**, Paquette, L. A. (1987). Enantiospecific Total Synthesis of the Sesquiterpene Antibiotics (-)-Punctatin A and (+)-Punctatin D. *J. Am. Chem. Soc*. 109, 3017-3024.
- Takase, R.**, Mikami, B., Kawai, S., Murata, K., Hashimoto, W. (2014). Structure-based conversion of the coenzyme requirement of a short-chain dehydrogenase/reductase involved in bacterial alginate metabolism. *J Biol Chem*. 289, 33198-33214.
- Takikawa, H.**, Imamura, Y., Sasaki M. (2006). Synthesis and absolute configuration of brevione B, an allelochemical isolated from *Penicillium sp.*. *Tetrahedron* 62, 39-48.
- Takusagawa, Y.**, Otagiri, M., Ui, S., Ohtsuki, T., Mimura, A., Ohkuma, M., Kudo, T. (2001). Purification and characterization of L-2,3-butanediol dehydrogenase of *Brevibacterium saccharolyticum* C-1012 expressed in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 65, 1876-1878.
- Tang, Y.**, Liu, J., Chen, P., Lv, M., Wang, Z., Huang, Y. (2014). Protecting-Group-Free Total Synthesis of Aplykurodinone-1. *J. Org. Chem*. 79, 11729-11734.
- Tubeleviciute, A.**, Teese, M. G., Jose, J. (2014). *Escherichia coli* kduD encodes an oxidoreductase that converts both sugar and steroid substrates. *Appl Microbiol Biotechnol*. 98, 5471-5485.
- Urano, N.**, Fukui, S., Kumashiro, S., Ishige, T., Kita, S., Sakamoto, K., Kataoka, M., Shimizu, S. (2011). Directed evolution of an aminoalcohol dehydrogenase for efficient production of double chiral aminoalcohols. *J Biosci Bioeng*. 111, 266-271.
- van der Werf, M. J.**, van der Ven, C., Barbirato, F., Eppink, M. H., de Bont, J. A., van Berkel, W. J. (1999). Stereoselective carveol dehydrogenase from *Rhodococcus erythropolis*

DCL14. A novel nicotinoprotein belonging to the short chain dehydrogenase/reductase superfamily. *J Biol Chem.* 274, 26296-26304.

Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., Taylor, R. D. (2003). Improved protein-ligand docking using GOLD. *Proteins* 52, 609-623.

Weaver, L. M., Gan, S., Quirino, B., Amasino, R. M. (1998). A comparison of the expression patterns of several senescence-associated genes in response to stress and hormone treatment. *Plant Mol Biol.* 37, 455-469.

Wieland, P., Miescher, K. (1950). Über die Herstellung mehrkerniger Ketone. *Helv. Chim. Acta* 33, 2215-2228.

Yamashita, A., Kato, H., Wakatsuki, S., Tomizaki, T., Nakatsu, T., Nakajima, K., Hashimoto, T., Yamada, Y., Oda, J. (1999). Structure of tropinone reductase-II complexed with NADP⁺ and pseudotropine at 1.9 Å resolution: implication for stereospecific substrate binding and catalysis. *Biochemistry* 38, 7630-7637.

Yamashita, A., Endo, M., Higashi, T., Nakatsu, T., Yamada, Y., Oda, J., Kato, H. (2003). Capturing enzyme structure prior to reaction initiation: Tropinone reductase-II-substrate complexes. *Biochemistry* 42, 5566-5573.

Yang, Z., Shannon, D., Truong, V.-L., Deslongchamps, P. (2002). Studies Directed toward Asymmetric Synthesis of Cardioactive Steroids via Anionic Polycyclization, *Org. Lett.* 4, 4693-4696.

Yin, B., Cui, D., Zhang, L., Jiang, S., Machida, S., Yuan, Y. A., Wei, D. (2014). Structural insights into substrate and coenzyme preference by SDR family protein Gox2253 from *Gluconobacter oxydans*. *Proteins* 82, 2925-2935.

Yoshimoto, T., Higashi, H., Kanatani, A., Lin, X. S., Nagai, H., Oyama, H., Kurazono, K., Tsuru, D. (1991). Cloning and sequencing of the 7 α -hydroxysteroid dehydrogenase gene from *Escherichia coli* HB101 and characterization of the expressed enzyme. *J Bacteriol.* 173, 2173-2179.

Yunus, U., Iqbal, R., Winterfeldt E. (2005). Synthesis of Chiral Building Blocks for Cephalostatin Analogues. *J. Heterocyclic Chem.* 42, 1079-1084.

Ziegler, J., Brandt, W., Geissler, R., Facchini, P. J. (2009). Removal of substrate inhibition and increase in maximal velocity in the short chain dehydrogenase/reductase salutaridine reductase involved in morphine biosynthesis. *J Biol Chem.* 284, 26758-26767.

Patente

WO 2009042984 A1: Codexis, Inc. (2009). Liang, J., Borup, B., Mitchell, V., Mundorff, E., Lalonde, J., Huisman, G. W.. Ketoreductase polypeptides and uses thereof.

WO 2011005527 A2: Codexis, Inc. (2011). Bong, Y. K., Vogel, M., Collier, S. J., Mitchell, V., Mavinahalli, J.. Ketoreductase-mediated stereoselective route to alpha chloroalcohols.

US 7879585 B2: Codexis, Inc. (2011). Giver, L. J., Newman, L. M., Mundorff, E., Huisman, G. W., Jenne, S. J., Zhu, J., Behrouzian, B., Grate, J. H., Lalonde, J.. Ketoreductase enzymes and uses thereof.

US 8513436 B2: Reata Pharmaceuticals, Inc. (2013). Anderson, E., Bolton, G. L., Caprathe, B., Jiang, X., Lee, C., Roark, W. H., Visnick, M.. Pyrazolyl and pyrimidinyl tricyclic enones as antioxidant inflammation modulators.

US 20110306579 A1: Emory University (2011). Stein, D. G.. Methods of neuroprotection using neuroprotective steroids and a vitamin d.

Publikationen und Tagungsbeiträge

Publikationen:

- **Schläger, S.**, Dräger, B. (2016). Exploiting plant alkaloids. *Curr. Opin. Biotechnol.* 37, 155-164.
- Fernandez, A., Levine, Z. B., Baumann, M., Sulzer-Mosse, S., Sparr, C., **Schläger, S.**, Metzger, A., Baxendale, I. R., Ley, S. V. (2013). Synthesis of (-)-Hennoxazole A: Integrating Batch and flow chemistry. *Synlett* 24, 514-518.

Tagungsbeiträge:

- 4th International Conference of Novel Enzymes 2014 in Ghent

Poster: **S. Schläger**, J. Fischer, W. Brandt, B. Dräger: „*Structure-function analyses of a short-chain dehydrogenase/reductase for coenzyme specificity and reduction of bicyclic diketones*”

- Botanikertagung 2013 in Tübingen

Poster: **S. Schläger**, N. Reinhardt, J. Fischer, E. Blum, W. Brandt, B. Dräger: „*Tropinone reductase-like enzymes from Arabidopsis thaliana - is it possible to change their coenzyme specificity?*”

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name Sabrina Schläger
Geburtsdatum 24.03.1987
Geburtsort Hildesheim

Akademischer Werdegang:

- 09/2012-05/2016 **Promotion** bei Prof. Dr. B. Dräger
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Pharmazie,
Pharmazeutische Biologie
*„Kurzketttige Dehydrogenasen/Reduktasen aus Pflanzen:
Anwendungsbezogene Untersuchungen zu Cosubstratpräferenz und
Reduktion bityklischer Diketone“*
- 10/2009 - 03/2012 **Masterstudium** der Wirk- und Naturstoffchemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Abschluss: Master of Science
Masterarbeit bei Prof. Dr. A. Kirschning
Insitut für Organische Chemie/Zentrum für Biomolekulare Wirkstoffe
(BMWZ)
„Studien zur Totalsynthese von Cebulactam A1 und A2“
- 10/2010 - 03/2011 **Auslandsstudium** (ERASMUS-Stipendium)
University of Cambridge (UK)
Forschungspraktikum bei Prof. Dr. S. V. Ley
Institut für Organische Chemie
„Studies towards the Total Synthesis of (-)-Hennoxazole A“
- 10/2006 - 09/2009 **Bachelorstudium** der Chemie
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
Abschluss: Bachelor of Science
Bachelorarbeit bei Juniorprof. Dr. M. M. K. Boysen
Institut für Organische Chemie
„Alken-Phosphinit Ligand auf Basis von D-Xylose“
- 1999 - 2006 **Abitur**, Gymnasium Sarstedt

Danksagung

Frau Prof. Dr. Birgit Dräger danke ich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, für die Möglichkeit an diesem interessanten Thema zu arbeiten, für die gewährten Freiheiten bei der Gestaltung und Umsetzung dieser Promotionsarbeit und für Ihre Unterstützung.

Ich danke dem Zweit- und Drittgutachter dieser Arbeit für die Übernahme dieser Funktion.

Ein besonderer Dank geht an Herrn Priv.-Doz. Dr. Carsten Milkowski und Frau Dr. Juliane Mittasch dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für mich und meine Arbeit hatten, für ihre fachliche Hilfe und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Milton T. Stubbs für die Möglichkeit der Durchführung der Kristallisationsexperimente in seiner Arbeitsgruppe. In diesem Zusammenhang danke ich besonders Herrn Dr. Christoph Parthier für seine geduldigen Einweisungen und Erklärungen, für seine ständige Hilfsbereitschaft, für die Datenprozessierung und Strukturlösung, für seine fachliche Hilfe und für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Wolfgang Brandt danke ich für das durchgeführte Docking, die fachliche Hilfe und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ich danke Herrn Priv.-Doz. Dr. Hauke Lilie für die Messungen und Auswertungen an der analytischen Ultrazentrifuge sowie für seine fachliche Hilfe.

Frau Priv.-Doz. Dr. Andrea Porzel und Frau Rica Patzschke danke ich für die NMR-Messungen. Herrn Dr. Andrej Frolov danke ich für die Messung und Auswertung der hochauflösenden Massen der Referenzsubstanzen und Herrn Dr. Wolfgang Hoehenwarter danke ich für die Untersuchung und Auswertung der SDS-Banden mittels LC-MS. Frau Dr. Silke Kuhfahl danke ich für die Hilfe bei Problemen mit der ÄKTA.

Ich danke der ehemaligen Arbeitsgruppe Dräger (Nadine Küster, Ralph Coppi, Sebastian Pietack, Mathias Reisberg, Nebojsa Jockovic, Anja Wodak und zusätzlich Bettina Rahfeld) für das kollegiale Verhältnis und die schöne gemeinsame Zeit. Nicole Reinhardt und Juliane Fischer danke ich für die Überlassung der Enzyme und Homologiemodelle sowie für die Hilfe bei Fragen zu ihren Arbeiten mit den SDR.

Schlussendlich geht mein größter Dank an meine Eltern, an meine Schwestern Nadin und Stefanie und an meine Freunde, deren Unterstützung und Motivation viel zu dieser Arbeit beigetragen haben. Nadin danke ich zudem für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Erklärung an Eides statt

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertationsschrift erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe. Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig ohne fremde Hilfe und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Inhaltlich oder wörtlich entnommene Stellen wurden von mir als solche gekennzeichnet.

Halle (Saale), den 24.08.2017

Sabrina Schläger