

**Strukturbiologische und biochemische Untersuchungen
von Prenyltransferasen und Amidsynthetasen
der Biosynthese von Ergotalkaloiden und Aminocoumarinantibiotika**

DISSERTATION

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

2010

vorgelegt von

Ute Metzger

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 2010

Dekan: Prof. Dr. L. Wesemann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Lutz Heide
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thilo Stehle

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Publikationen und Tagungsbeiträge.....	IV
Beiträge anderer Wissenschaftler zu dieser Arbeit.....	VI
Abkürzungen.....	VII
Glossar	X
1 Einleitung	1
1.1 Ergotalkaloide.....	1
1.2 Aminocoumarinantibiotika.....	2
1.3 Prenyltransferasen.....	4
1.4 Amidsynthetasen	7
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	9
2 Material und Methoden.....	11
2.1 Geräte.....	11
2.2 Chemikalien, Enzyme und <i>Kits</i>	13
2.2.1 Chemikalien.....	13
2.2.2 Enzyme	15
2.2.3 Kits	15
2.3 Bakterienstämme, Plasmide und <i>primer</i>	16
2.3.1 Bakterienstämme	16
2.3.2 Plasmide und Cosmide	16
2.3.3 Primer.....	19
2.4 Medien, Puffer und Lösungen.....	21
2.4.1 Nährmedien.....	21
2.4.2 Puffer und Lösungen für die Plasmidpräparation	21
2.4.3 Puffer und Lösungen für die Elektrophorese	22
2.4.4 Puffer und Lösungen für die Proteinreinigung	23
2.4.5 Puffer und Lösungen für die DMAPP-Synthese	24
2.4.6 Sonstige Puffer und Lösungen	24
2.5 Methoden der Molekularbiologie.....	25
2.5.1 Plasmidpräparation und Reinigung von DNA	25
2.5.2 Quantifizierung von DNA.....	26
2.5.3 DNA-Sequenzierung	26

2.5.4	Agarosegel-Elektrophorese	26
2.5.5	Polymerase-Kettenreaktion	27
2.5.6	Ortsgerichtete Mutagenese	29
2.5.7	Restriktion und Ligation	30
2.5.8	Transformation	30
2.6	Proteinpräparation	31
2.6.1	Heterologe Proteinexpression	31
2.6.2	Proteinreinigung	32
2.7	Proteincharakterisierung	34
2.7.1	Quantifizierung von Proteinen	34
2.7.2	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese	34
2.7.3	Dynamische Lichtstreuung	35
2.7.4	Circulardichroismus	35
2.7.5	Enzymassays	35
2.8	Proteinkristalle	38
2.8.1	Kristallisation von Proteinen	38
2.8.2	Cokristallisation	39
2.8.3	Tränkeexperimente	39
2.8.4	Methylierung von Proteinen	39
2.8.5	Montage von Proteinkristallen	40
2.8.6	Kristallographische Datensammlung	40
2.9	Chemische Synthese von DMAPP	41
3	Ergebnisse und Diskussion.....	42
3.1	Strukturbiologische Untersuchungen zur Dimethylallyltryptophansynthase	
	FgaPT2.....	42
3.1.1	Expression und Reinigung von FgaPT2 und FgaPT2-SeMet.....	42
3.1.2	Kristallisation von FgaPT2 und FgaPT2-SeMet.....	43
3.1.3	Strukturlösung von FgaPT2.....	44
3.1.4	Strukturbeschreibung von FgaPT2.....	45
3.1.5	Reaktionsmechanismus der Dimethylallyltryptophansynthase.....	48
3.1.6	Dimethylallyltryptophansynthase aus verschiedenen Pilzen	52
3.1.7	Mutagenese von FgaPT2	52
3.1.8	Regiospezifität verschiedener Indol-Prenyltransferasen aus Pilzen	53
3.1.9	Gemeinsame Architektur aromatischer Prenyltransferasen in Bakterien und Pilzen.....	54
3.2	Strukturbiologische und biochemische Untersuchungen zur aromatischen Prenyltransferase CloQ	56
3.2.1	Expression und Reinigung von CloQ.....	56
3.2.2	Mutagenese von CloQ.....	57
3.2.3	Kristallisation von CloQ, CloQ-C215S und CloQ-R66S.....	58

3.2.4	Strukturlösung von CloQ, CloQ-C215S und CloQ-R66S	59
3.2.5	Strukturbeschreibung von CloQ, CloQ-C215S und CloQ-R66S	60
3.2.6	Bindestelle von 4-HPP in CloQ.....	63
3.2.7	Hypothetische Bindestelle für DMAPP	66
3.2.8	Reaktionsmechanismus von CloQ	68
3.2.9	Biochemische Untersuchungen zu CloQ und den CloQ-Mutanten.....	69
3.3	Kristallisation der Amidsynthetase NovL.....	73
3.3.1	Klonierung von <i>novL</i> , <i>cloL</i> , <i>couL</i> und <i>simL</i>	73
3.3.2	Expression und Reinigung der Amidsynthetasen	73
3.3.3	<i>Screening</i> von Kristallisationsbedingungen.....	75
3.3.4	Optimierung des Kristallwachstums von NovL	75
3.4	Untersuchungen zur Substratspezifität der Amidsynthetasen NovL und CouL...	77
3.4.1	Herstellung der chimären Gene aus <i>novL</i> und <i>couL</i>	77
3.4.2	Expression und Reinigung der NovL-CouL-Chimäre.....	80
3.4.3	Aktivitätsbestimmungen für die NovL-CouL-Chimäre.....	81
3.4.4	Vergleich von NovL und CouL mit anderen adenylatbildenden Enzymen .	84
4	Zusammenfassung	88
5	Literatur	90
6	Anhang	99
	Danksagung	100
	Akademische Lehrer	102
	Lebenslauf.....	103

Publikationen und Tagungsbeiträge

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit wurde in folgendem Artikel veröffentlicht:

Metzger U, Schall C, Zocher G, Unsöld I, Stec E, Li SM, Heide L, Stehle T (2009)
The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14309-14.

Zwei Publikationen sind in Vorbereitung:

Metzger U, Keller S, Stevenson CEM, Heide L, Lawson DM
Structure-function studies of the aromatic prenyltransferase CloQ from the clorobiocin biosynthetic pathway.

Metzger U, Fischer S, Heide L
Sequence elements of amide synthetases involved in substrate recognition.

Posterpräsentationen bei Tagungen

Boll B, Alt S, Hennig S, **Metzger U**, Stehle T, Heide L. Biochemical and crystallization studies of amide synthetases. Symposium 2010, SFB 766 Bacterial Cell Envelope. Freudenstadt, Deutschland, März 2010.

Romir J, **Metzger U**, Stehle T, Heide L. Towards the Structure of NovL. Symposium 2010, SFB 766 Bacterial Cell Envelope. Freudenstadt, Deutschland, März 2010.

Metzger U, Li SM, Lawson D, Heide L. Enzymatic catalysis of Friedel-Crafts alkylations: The aromatic prenyltransferases CloQ and FgaPT2. Symposium "Aktuelle Entwicklungen in der Naturstoff-Forschung", 22. Irseer Naturstofftage der DECHEMA e.V. Irsee, Deutschland, Februar 2010.

Alt S, **Metzger U**, Romir J, Anderle C, Stehle T, Heide L. Generation of aminocoumarin antibiotics with catechol structures. 1st International Symposium on the Bacterial Cell Envelope: Structure, Function, and Infection Interface. Blaubeuren, Deutschland, Oktober 2009.

Metzger U, Schall C, Zocher G, Unsöld I, Stec E, Li SM, Stehle T, Heide L. The structure of the dimethylallyl tryptophan synthase FgaPT2 reveals a common origin of aromatic prenyltransferases in actinomycetes and fungi. 15th International Symposium on the Biology of Actinomycetes. Shanghai, China, August 2009.

Metzger U, Keller S, Lawson D, Heide L. Site-directed mutagenesis of the aromatic prenyltransferase CloQ from the clorobiocin biosynthetic cluster of *Streptomyces roseochromogenes*. International VAAM Workshop "Biology and Chemistry of Antibiotic-Producing Bacteria". Berlin, Deutschland, September 2008.

Metzger U, Heide L. Investigation of amide synthetases of aminocoumarin biosynthesis. 10th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms. Prag, Tschechische Republik, Juni 2006.

Beiträge anderer Wissenschaftler zu dieser Arbeit

Strukturaufklärung der Dimethylallyltryptophansynthase (DMATS)

Hierbei handelt es sich um ein Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thilo Stehle (Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen). Die kristallographische Datensammlung einschließlich ihrer Auswertung und die Tränkexperimente mit Schwermetallatomen wurden von Dr. Christoph Schall und Dr. Georg Zocher durchgeführt.

Die Herstellung des Expressionskonstrukts pIU18, Überproduktion und Reinigung der ersten Proteinchargen und erste Optimierungen der Kristallisationsbedingungen wurden von Dr. Inge Unsöld in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. L. Heide durchgeführt (Unsöld, 2006).

Strukturbiologische Untersuchungen zur Prenyltransferase CloQ

Hierbei handelt es sich um ein Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Dr. David Lawson (Department of Biological Chemistry, John Innes Centre, Norwich, UK). Die kristallographische Datensammlung einschließlich ihrer Auswertung wurden von Dr. Clare E. M. Stevenson und Dr. David M. Lawson durchgeführt. Das Auffinden der Kristallisationsbedingungen und die Strukturaufklärung der WT-4HPP-Struktur erfolgten durch Dr. Sascha Keller in der Arbeitsgruppe von Dr. David Lawson (Keller *et al.*, 2006).

Strukturbiologische Untersuchungen zur Amidsynthetase NovL

Hierbei handelt es sich um ein Kooperationsprojekt mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thilo Stehle (Interfakultäres Institut für Biochemie, Universität Tübingen). Die kristallographische Datensammlung einschließlich ihrer Auswertung und die Tränkexperimente mit Schwermetallatomen wurden von Johannes Romir durchgeführt.

Untersuchungen zur Substratspezifität der Amidsynthetasen NovL und CouL

Teile dieses Projektes wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Silke Fischer, Studentin der Hochschule Esslingen, unter meiner Anleitung bearbeitet.

Abkürzungen

°C	Grad Celsius
λ	Wellenlänge
μ	mikro
Å	Angström
A	Extinktion
Abb.	Abbildung
AMP-PNP	Adenosin 5'-(β , γ -imido)triphosphat Tetralithiumsalzhydrat
AMP-PCP	Adenylylmethylenediphosphonat Dinatriumsalz
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bidest.	bidestilliert
BSA	Rinderserumalbumin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
c	centi
ca.	circa
1,6-DHN	1,6-Dihydroxynaphthalin
Da	Dalton
DC	Dünnschichtchromatographie
d.h.	das heißt
DLS	<i>Diamond Light Source</i>
DMAB	Dimethylaminboran-Komplex
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMASPP	Dimethylallyl-S-thiolopyrophosphat
DMATS	Dimethylallyltryptophansynthase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESI	Elektronenspray-Ionisation
ESRF	<i>European Synchrotron Radiation Facility</i>
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
FPP	Farnesylpyrophosphat
g	Gramm
GPP	Geranylpyrophosphat
GSPP	Geranyl-S-thiolopyrophosphat
h	Stunde

Abkürzungen

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
4-HPP	4-Hydroxyphenylpyruvat
IMAC	immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IPTG	Isopropyl- β -thiogalactosid
k	kilo
kb	Kilobasen
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
k_{cat}	Wechselzahl
L	Liter
LC-MS	Flüssigchromatographie gekoppelt mit Massenspektrometrie
Lsg.	Lösung
m	milli / Meter
M	molar
min	Minute(n)
MOPSO	3-Morpholino-2-hydroxypropansulfonsäure
MWCO	Ausschlussgrenze für Molekularmassen
n	nano
Ni-NTA	Nickel-Nitriloacetat
NRPS	nicht-ribosomale Peptidsynthetase
OD	Optische Dichte
p.a.	zur Analyse
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP_i	Pyrophosphat
PT	Prenyltransferase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RP	<i>reversed phase</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S.	<i>Streptomyces</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SeMet	Selenomethionin
SLS	<i>Swiss Light Source</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TIM	Triosephosphatisomerase
Tab.	Tabelle
TFA	Trifluoressigsäure
U	unit

Abkürzungen

UV	ultraviolett
V	Volt
VIS	sichtbar (engl.: <i>visible</i>)
vgl.	vergleiche
V_{\max}	Maximalgeschwindigkeit
v/v	Volumenanteile auf Gesamtvolumen
WT	Wildtyp
w/v	Masse pro Volumen
$\times g$	Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactosid
z.B.	zum Beispiel

Glossar

<i>alignment</i>	Anpassung von Proteinsequenzen zum Vergleich
<i>barrel</i>	Art der Proteinfaltung: Fass-Struktur
<i>beamline</i>	Messplatz am Synchrotron
<i>cryo-loop</i>	Nylonschleife zum Montieren von Kristallen im Stickstoffstrom auf dem Goniometerkopf
<i>cryo protectant</i>	Glasbildner, Zusatz zum Vermeiden von Eiskristallen beim Schockgefrieren
<i>hanging drop</i>	Hängetropfen-Methode zum Kristallisieren
<i>kit</i>	Zusammenstellung von Lösungen und Reagenzien
<i>loop</i>	schleifenförmiger Verlauf der Polypeptidkette in Proteinstrukturen
<i>primer</i>	Oligonukleotid am Synthesebeginn eines komplementären Stranges von DNA
<i>rigid body</i>	fester Körper in gleichnamiger Verfeinerungsmethode
<i>scan</i>	Reihenmessung, bei der ein Parameter kontinuierlich geändert wird
<i>screen</i>	Reihenexperiment, z. B. bei der Kristallisation
<i>sitting drop</i>	Sitztropfen-Methode zum Kristallisieren
<i>template</i>	Matrize

1 Einleitung

1.1 Ergotalkaloide

Ergotalkaloide gehören zu den bedeutendsten Toxinen und Pharmaka natürlichen Ursprungs der Menschheitsgeschichte (Scharidl *et al.*, 2006). Sie stellen eine komplexe Familie von Mycotoxinen dar, die sich vom Tryptophan ableiten (Flieger *et al.*, 1997) und enthalten in den meisten Fällen das tetrazyklische Ergolin-Grundgerüst (Abb. 1.1). Aufgrund ihrer Struktur können sie in zwei Klassen eingeteilt werden, in die Clavine und die D-Lysergsäureamide. Die Clavine werden vorrangig von Pilzen der Ordnung *Eurotiales*, wie z.B. *Aspergillus fumigatus*, produziert, während die D-Lysergsäureamide von Pilzen der Familie *Clavicipitaceae* produziert werden. Besonders bekannt unter dem Namen „Mutterkorn“ ist das Sklerotium von *Claviceps purpurea* im Roggenkorn, das durch die enthaltenen Ergotalkaloide vor allem im Mittelalter zu schweren Vergiftungsepidemien geführt hat und auch heute noch in der Tierfütterung ein Problem darstellen kann (Gröger & Floss, 1998; Scharidl *et al.*, 2006). Die medizinische Anwendung wurde bereits im 16. Jh. beschrieben (Lonicer, 1582). Sowohl die natürlich gebildeten Ergotalkaloide als auch ihre partialsynthetischen Derivate finden eine breite Anwendung in der modernen Medizin. Für die pharmakologische Wirkung ausschlaggebend ist die Strukturähnlichkeit zu verschiedenen Neurotransmittern wie Dopamin, Noradrenalin oder Serotonin. Kaum eine andere Naturstoffgruppe hat ein so breites Spektrum an biologischen Aktivitäten, Anwendungsgebiete sind z.B. Hypertonie, Prävention postpartaler Blutung, Hemmung der Laktation, Therapie von Migräne und seniler zerebraler Insuffizienz. Aufgrund dessen wurden die Ergotalkaloide auch vielfach als Leitstrukturen für die Synthese neuer Arzneistoffe verwendet (Haarmann *et al.*, 2006; Mantegani *et al.*, 1999).

In der Biosynthese der Ergotalkaloide ist der initiale Schritt die Prenylierung von L-Tryptophan durch DMAPP unter Bildung von 4-Dimethylallyltryptophan, eine von der 4-Dimethylallyltryptophansynthase (DMATS; E.C.2.5.1.34) katalysierten Reaktion. Alle folgenden enzymatischen Schritte betreffen den Aufbau und die Modifizierung der Ringe C und D des Ergolinringgerüsts unter Bildung verschiedenster Ergotalkaloide und sind nur vereinzelt vollständig beschrieben (Abb. 1.1).

Die DMATS wurde zum ersten Mal 1971 beschrieben (Heinstein *et al.*, 1971) und später zur Homogenität aufgereinigt (Gebler & Poulter, 1992; Lee *et al.*, 1976). Sie ist ein lösliches dimeres Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 105 kDa. Die biochemischen Eigenschaften dieses Enzyms sind von verschiedenen Gruppen untersucht worden (Cress *et al.*, 1981; Gebler & Poulter, 1992; Lee *et al.*, 1976). 1995 wurde in *Claviceps fusiformis* das Gen der DMATS, genannt *dmaW*, identifiziert und das Protein heterolog exprimiert (Tsai *et al.*, 1995). Ein ähnliches Gen, *fgaPT2*,

existiert im Biosynthesegencluster der Fumigaclavine in *Aspergillus fumigatus* und wurde 2005 heterolog exprimiert und charakterisiert (Unsöld & Li, 2005). In den darauf folgenden Jahren wurde ein weiteres ähnliches Enzym aus *Malbranchea aurantiaca* beschrieben (Ding *et al.*, 2008) und es wurden weitere Homologe zur DMATS in verschiedenen Genomen von Pilzen entdeckt.

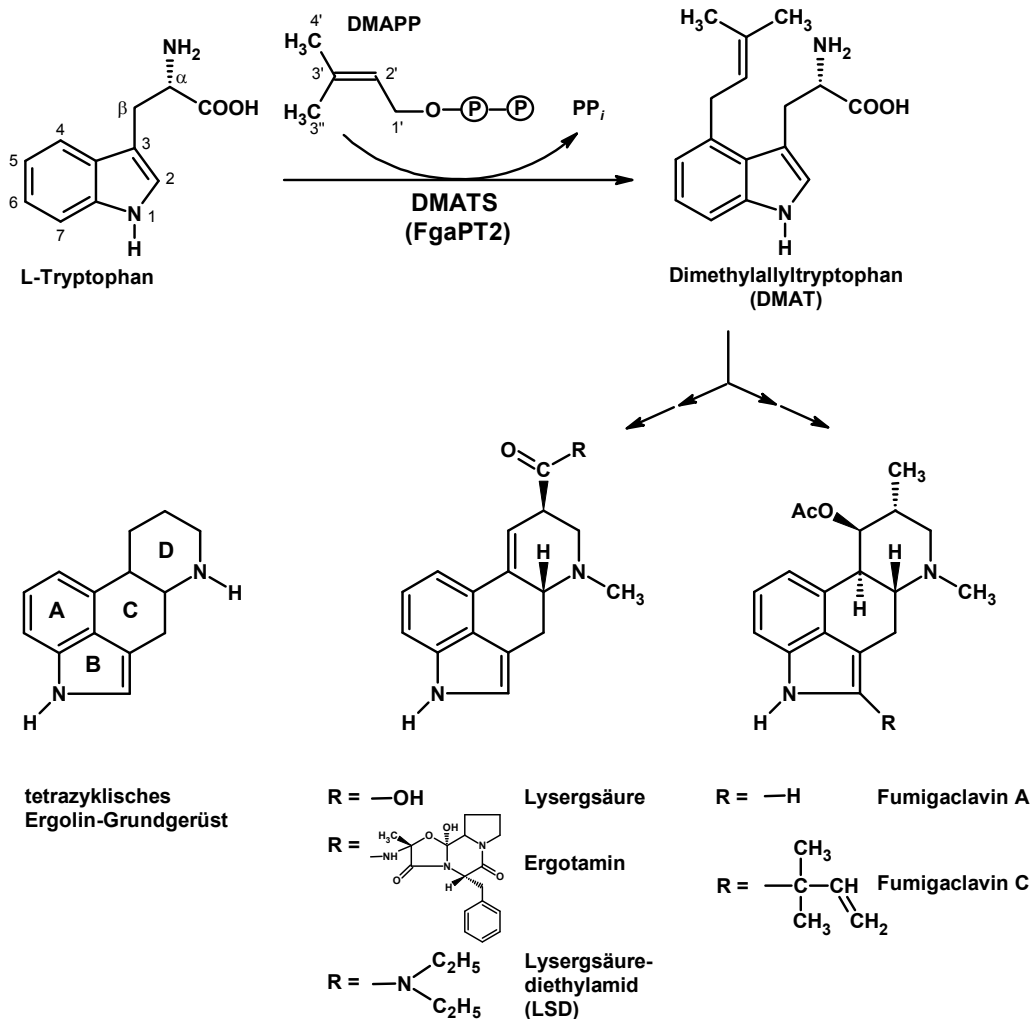


Abb. 1.1 DMATS-Reaktion und Struktur von Ergotalkaloiden.

1.2 Aminocoumarinantibiotika

Die Aminocoumarinantibiotika Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A1 (Abb. 1.2) sind potente Gyraseinhibitoren (Maxwell & Lawson, 2003) und werden von *Streptomyces spheroides* [syn. *S. caeruleus* (Lanoot *et al.*, 2002)], *Streptomyces roseochromogenes* und *Streptomyces risheriensis* produziert (Berger *et al.*, 1978). Ihre chemische Struktur ist charakterisiert durch einen 3-Amino-4,7-dihydroxy-coumarinring (3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin), der mit einem Desoxy-zucker (Noviose) und einer Säurekomponente verknüpft ist. Bei Novobiocin und

Clorobiocin handelt es sich bei der Säurekomponente um eine C5-prenylierte 4-Hydroxybenzoesäure und bei Coumermycin A₁ um die 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure, die an beiden Carboxygruppen mit einem Aminocoumarinring verknüpft ist und somit ein Diamid bildet. Im Novobiocin ist die Hydroxygruppe an Position 3 der Noviose mit einer Carbamoylgruppe acyliert, während in den anderen beiden Verbindungen diese Hydroxygruppe mit einer 5-Methylpyrrol-2-carbonsäure verestert ist. Eine Besonderheit von Clorobiocin ist die Substitution des 3-Amino-4,7-dihydroxycoumarinrings an Position 8 mit einem Chloratom, während Novobiocin und Coumermycin A₁ an dieser Stelle durch eine Methylgruppe substituiert sind. Neben den „klassischen“ Aminocoumarinantibiotika wurden zwei weitere identifiziert: Simocyclinon D8 (Holzenkämpfer *et al.*, 2002; Schimana *et al.*, 2000) und Rubradirin (Bhuyan *et al.*, 1965; Sohng *et al.*, 1997) (Abb. 1.2).

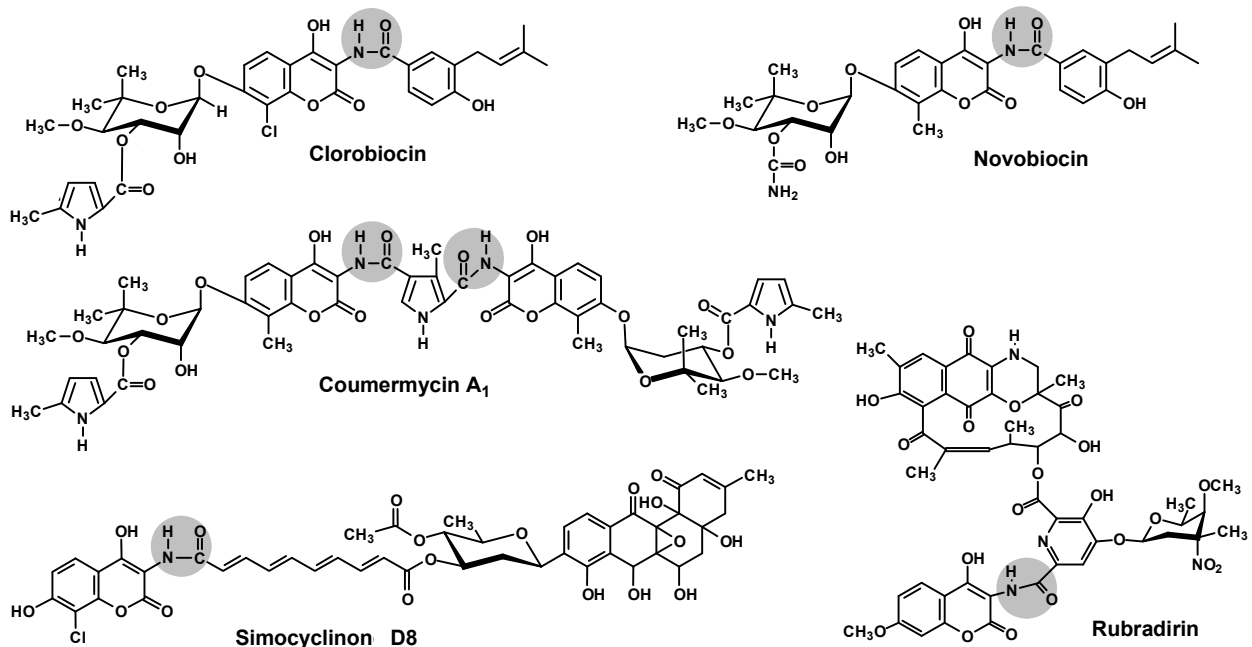


Abb. 1.2 Die Aminocoumarinantibiotika Novobiocin, Clorobiocin, Coumermycin A₁, Simocyclinon D8 und Rubradirin. Die Amidbindungen zur Verknüpfung der Aminocoumarin- mit der Säureeinheit sind grau hinterlegt.

Die Wirkung von Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ beruht auf der Hemmung der ATP-abhängigen DNA-Überspiralisierung, die durch die DNA-Gyrase, der Klasse der Topoisomerasen vom Typ II, katalysiert wird. Alle drei Aminocoumarinantibiotika konkurrieren mit ATP um die Bindung an die B-Untereinheit der bakteriellen Gyrase. Röntgenstrukturanalysen konnten zeigen, dass der Aminocoumarinteil und der substituierte Desoxyzucker dieser Verbindungen essentiell für ihre Bindung an die B-Untereinheit der Gyrase sind (Lafitte *et al.*, 2002; Lewis *et al.*, 1996; Maxwell, 1993; Tsai *et al.*, 1997).

Novobiocin wurde als Antibiotikum zur Behandlung von Infektionen mit multiresistenten gram-positiven Bakterien in den USA (Albamycin[®]) zugelassen. Seine antibakterielle Aktivität konnte dabei sowohl in *in-vitro*-Studien als auch in klinischen Studien nachgewiesen werden (French *et al.*, 1993; Raad *et al.*, 1998; Walsh *et al.*, 1985). Schwere Nebenwirkungen, die schlechte Wasserlöslichkeit, die geringe Aktivität gegenüber gram-negativen Bakterien, verursacht durch die geringe Permeabilität durch die Bakterienzellwand (Maxwell, 1993) und die rasche Resistenzentwicklung verhinderten eine breite Anwendung dieses Antibiotikums. Neben seiner antibiotischen Wirkung konnten für Novobiocin weitere Wirkungen nachgewiesen werden: z.B. die synergistische Wirkung mit Zytostatika (Rappa *et al.*, 1992), die Interaktion mit dem eukaryotischen Hitzeschockprotein Hsp90, das eine wichtige Rolle in der Stabilität und Funktion vieler Zellsignalmoleküle spielt (Allan *et al.*, 2006; Marcu *et al.*, 2000) und die antiproliferative Wirkung auf menschliche Myelomzellen (Thiele *et al.*, 2002).

Die Biosynthesegencluster von Novobiocin, Clorobiocin und Coumermycin A₁ wurden identifiziert, kloniert und sequenziert (Pojer *et al.*, 2002; Steffensky *et al.*, 2000b; Wang *et al.*, 2000). Inzwischen ist die Funktion nahezu aller Gene bekannt und somit gehört die Biosynthese von Novobiocin und Clorobiocin zu den am besten verstandenen Biosynthesewegen des Sekundärstoffwechsels in Streptomyceten.

1.3 Prenyltransferasen

Prenyltransferasen verknüpfen Prenylgruppen, die von allylischen Prenyldiphosphaten wie DMAPP, GPP oder FPP stammen, mit Akzeptormolekülen. Die archetypische Prenyltransferase des Primärstoffwechsels ist die FPP-Synthase (Poulter, 2006). Deren Reaktion verläuft über die Bildung eines Carbokations, das bei der Abspaltung der Pyrophosphatgruppe vom C-1 des allylischen Substrates DMAPP oder GPP gebildet wird, gefolgt von einem elektrophilen Angriff auf die 3,4-Doppelbindung des Isopentenylidiphosphats (IPP). Wie alle *trans*-Prenyldiphosphat-Synthasen enthält die FPP-Synthase zwei konservierte (N/D)DxxD-Motive, die die Bindestellen für das allylische und das homoallylische Substrat darstellen. Die Substrate binden in Form von Magnesiumkomplexen, und die Aspartatreste in den konservierten Motiven dienen dazu, die Magnesiumionen zu chelatisieren. Die dreidimensionale Struktur der *trans*-Prenyldiphosphatsynthasen besteht ausschließlich aus α -Helices (Liang *et al.*, 2002).

Die Vertreter der Gruppe der aromatischen Prenyltransferasen katalysieren eine elektrophile Substitutionsreaktion an aromatischen Akzeptormolekülen mit allylischen Isopreneinheiten. Dabei entstehen Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen zwischen dem

aromatischen Ring des Akzeptormoleküls und entweder dem C-1-Atom (reguläre Prenylierung) oder C-3-Atom (reverse Prenylierung) des isoprenoiden Substrats. Chemisch gesehen handelt es sich bei diesen Reaktionen um die Alkylierung aromatischer Verbindungen, also um Friedel-Crafts-Reaktionen. Die Prenylierung aromatischer Verbindungen hat zu einer großen Vielfalt von Sekundärstoffen in der Natur geführt. Die entstehenden Hybrid-Isoprenoide unterscheiden sich oftmals in ihren Eigenschaften und biologischen Aktivitäten von ihren nicht-prenylierten Vorstufen (Botta *et al.*, 2005b). Die Fähigkeit der Enzyme, C-Prenylierungen von Aromaten mit unterschiedlicher Substrat- und Regiospezifität zu katalysieren, macht sie für die chemoenzymatische Synthese von bioaktiven Substanzen interessant (Botta *et al.*, 2005a; Koehl, 2005; Macone *et al.*, 2009). Bis vor kurzem waren allerdings nur sehr wenige Enzyme bekannt, die Friedel-Crafts-Alkylierungen zu katalysieren vermögen. Einige aromatische Prenyltransferasen sind in der Vergangenheit untersucht worden. Meist handelte es sich dabei um Enzyme aus dem Primärstoffwechsel wie z.B. UbiA aus der Ubichinon-Biosynthese (Melzer & Heide, 1994), aber auch MenA aus der Menachinon-Biosynthese (Suvarna *et al.*, 1998), Slr1736 aus der Tocopherol-Biosynthese (Schledz *et al.*, 2001) oder Pds2 aus der Plastochinon-Biosynthese (Collakova & DellaPenna, 2001) sowie die Protohäm IX-Synthase (Mogi *et al.*, 1994). Ähnliche Enzyme sind im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel an der Bildung von prenylierten Flavonoiden und Isoflavonoiden sowie an der Bildung des Naphthochinon-Derivates Shikonin beteiligt (Akashi *et al.*, 2009; Ohara *et al.*, 2009; Sasaki *et al.*, 2008). All diese Prenyltransferasen sind integrale Membranproteine und ihre Raumstruktur konnte bisher nicht experimentell aufgeklärt werden. Jedoch sind kürzlich Strukturmodelle von zwei Enzymen dieser Gruppe veröffentlicht worden (Brauer *et al.*, 2008; Ohara *et al.*, 2009). Ähnlich wie die FPP-Synthase weisen alle Mitglieder dieser Gruppe die typischen aspartatreichen Motive (N/D)DxxD als Bindestellen für das Isoprenyldiphosphat auf, und alle benötigen Magnesiumionen als Cofaktor.

Eine neue Gruppe aromatischer Prenyltransferasen, die lösliche Enzyme umfasst, konnte vor wenigen Jahren identifiziert werden. Als erstes bakterielles Enzym dieser Gruppe wurde CloQ aus der Biosynthese des Aminocoumarinantibiotikums Clorobiocin in *Streptomyces roseochromogenes* gefunden (Pojer *et al.*, 2003). CloQ und auch NovQ katalysieren die Prenylierung des 4-Hydroxyphenylpyruvats am C-3-Atom des aromatischen Rings, wobei DMAPP als Prenyldonor fungiert (Abb. 1.3). 2005 gelang die Identifizierung und die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von NphB aus *Streptomyces* sp. CL190, der aromatischen Prenyltransferase der Naphterpin-Biosynthese (Kuzuyama *et al.*, 2005). NphB wies ein neuartiges Strukturprinzip auf, das PT-*barrel* genannt wurde. Inzwischen wurden 18 Gene (13 bakterielle Gene und 5 Gene aus Pilzen) mit Sequenzähnlichkeit zu CloQ und NphB identifiziert und neun davon biochemisch untersucht. Diese Enzyme besitzen keine (N/D)DxxD-Motive und sind, abgesehen von NphB, auch in Abwesenheit zweiwertiger Metallionen aktiv. Sie prenylieren unterschiedliche aromatische

Substrate wie Hydroxynaphthalin-Derivate (Haagen *et al.*, 2006; Haug-Schifferdecker *et al.*, 2010; Kumano *et al.*, 2008; Kuzuyama *et al.*, 2005), Phenazin-Derivate (Saleh *et al.*, 2009) und 4-HPP (Ozaki *et al.*, 2009; Pojer *et al.*, 2003).

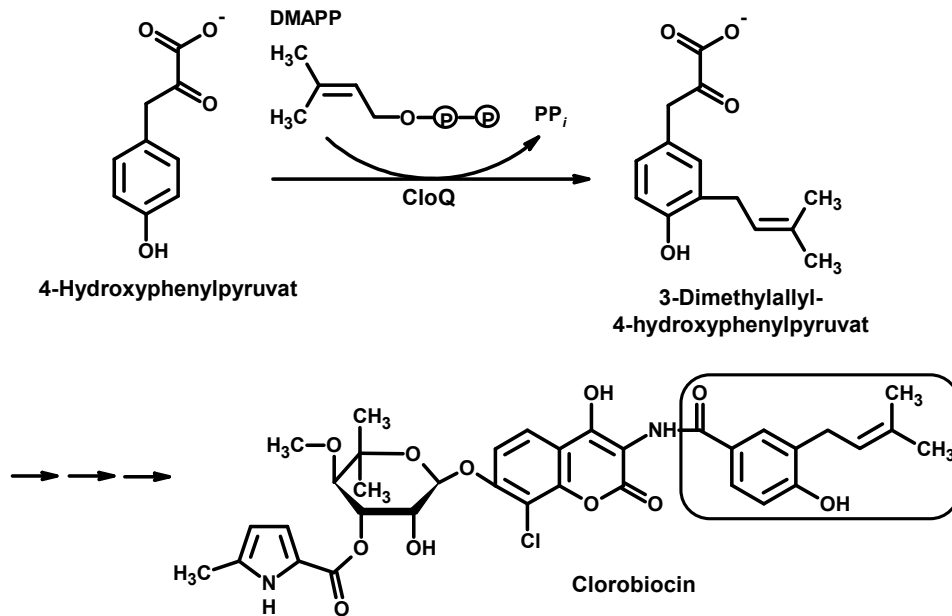


Abb. 1.3 CloQ-Reaktion und Struktur von Clorobiocin.

Neben der CloQ/NphB-Gruppe wurden in jüngster Zeit eine Vielzahl aromatischer Prenyltransferasen aus Pilzen, aber auch einige aus Bakterien identifiziert und charakterisiert (Edwards & Gerwick, 2004; Schultz *et al.*, 2010; Steffan *et al.*, 2009). Diese Prenyltransferasen katalysieren die Prenylierung von Indoleinheiten, es sind lösliche Proteine, enthalten keine (N/D)DxxD-Motive und sind in ihrer katalytischen Aktivität unabhängig von Mg²⁺-Ionen. Obwohl sie ähnliche Eigenschaften wie die Enzyme der CloQ/NphB-Gruppe aufweisen, besitzen sie keine Sequenzähnlichkeiten mit dieser Enzymgruppe. Die DMATS FgaPT2 aus *Aspergillus fumigatus* ist ein Vertreter der Indol-Prenyltransferasen und katalysiert die Prenylierung von L-Tryptophan am C-4 des Indolrings, wobei DMAPP als Prenyldonor fungiert (Abb. 1.1). Die Vielzahl der DMATS-Homologe katalysieren Prenylierungsreaktionen an unterschiedlichen Ringatomen, sie katalysieren reguläre Prenylierungen sowie reverse Prenylierungen.

1981 wurde die Kristallisation der DMATS von *Claviceps* (Cress *et al.*, 1981) vorgestellt. Zu Beginn dieser Arbeit lagen jedoch keinerlei Strukturdaten zu einem Vertreter der Indol-Prenyltransferasen vor.

1.4 Amidsynthetasen

Der erste Schritt zur Bildung eines Aminocoumarinantibiotikums ist die Verknüpfung der Acylkomponente mit dem Aminocoumarinring unter Ausbildung einer Amidbindung und wird von der jeweiligen Amidsynthetase (NovL, CloL oder CouL) katalysiert. Das aus der Reaktion mit NovL resultierende Produkt ist die Novobiocinsäure. Die Aktivität der Novobiocinsäure-Synthetase konnte bereits im Rohextrakt von *Streptomyces niveus* nachgewiesen werden (Kominek & Meyer, 1975). Die ATP-abhängige Reaktion deutete auf eine Aktivierung der Carboxygruppe des Säuresubstrats hin. Dies wurde jedoch erst 2000 durch die Identifizierung und Charakterisierung von NovL bestätigt (Steffensky *et al.*, 2000a). Mit einem ATP-PPi-Austausch-Assay wurde die Adenylierungsaktivität von NovL gezeigt. Erst nach Bildung des Säure-AMP-Intermediats erfolgt der Transfer der Acyl-Gruppe auf die Aminogruppe von 3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin. Interessanterweise wurde für CouL gezeigt, dass die Ausbildung beider Amidbindungen, die zwischen der zentralen Pyrroldicarbonsäure und zwei Ring-B-Einheiten geknüpft werden (Abb. 1.2), von diesem Enzym alleine, ohne Beteiligung eines weiteren Enzyms katalysiert wird (Schmutz *et al.*, 2003).

Bei einer großen Zahl therapeutisch nutzbarer zyklischer und linearer Peptide wird die Amidbindung nicht-ribosomal über die Enzymgruppe der nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) gebildet (Weber & Marahiel, 2001). Diese Enzyme sind in unterschiedlichen Modulen aus je ca. 1000 Aminosäuren organisiert, wobei jedes Modul wiederum in verschiedene Domänen eingeteilt wird (Marahiel *et al.*, 1997; Weber & Marahiel, 2001). Jede Domäne übernimmt eine bestimmte Funktion während der Verknüpfung der Aminosäuren. Der erste Schritt der Verknüpfung ist die Auswahl und die Aktivierung einer Aminosäure unter ATP-Verbrauch. Diese Funktion übernimmt die Adenylierungsdomäne (A-Domäne) (Stachelhaus & Marahiel, 1995; Turgay *et al.*, 1992). Die aktivierte Aminosäure wird über einen Thioester kovalent an die Peptidylcarrierdomäne (P-Domäne) gebunden (Stachelhaus *et al.*, 1996). Die P-Domäne leitet die Aminosäure an die Kondensationsdomäne (C-Domäne) weiter, an der die Kondensation mit einer zweiten aktivierten Aminosäure erfolgt (Stachelhaus *et al.*, 1998). Die zu verknüpfenden Aminosäuren bleiben während des gesamten Vorgangs am Enzym gebunden. Um einen höheren Grad an Diversität zu erzeugen, können neben den drei erwähnten Domänen noch weitere modifizierende Domänen im Modul beteiligt sein, die z.B. zur Epimerisierung, Methylierung oder Ringschließung dienen (Konz & Marahiel, 1999). Ebenso kann eine NRPS wiederum Teil eines so genannten Hybridenzym sein, das zusätzlich noch eine Polyketidsynthase (PKS) enthält.

Inzwischen liegen auch dreidimensionale Strukturen einzelner NRPS-Domänen vor und geben Einblick in den Mechanismus dieses Enzymkomplexes (Marahiel & Essen, 2009). Die Struktur der Adenylierungsdomänen, z.B. PheA, eine Untereinheit

der Gramacidinsynthetase (Conti *et al.*, 1997) und DhbE, eine Adenylierungsdomäne der NRPS aus der Bacillibactin-Biosynthese (May *et al.*, 2002), sind hinsichtlich der Amidsynthetasen von besonderem Interesse.

In der Vergangenheit gab es einige Studien zur Ableitung der Substratspezifität der Adenylierungsdomänen von NRPS anhand der Aminosäuresequenz, um damit vorhersagen zu können, welche Aminosäure von der Domäne adenyliert wird (Challis *et al.*, 2000; Stachelhaus *et al.*, 1999).

Auch die an der Biosynthese der Aminocoumarinantibiotika beteiligten Amidsynthetasen weisen einige für adenylatbildende Enzyme, wie 4-Coumarat-CoA-Ligasen (Stuible *et al.*, 2000) und A-Domänen von NRPS (Marahiel *et al.*, 1997) typische Motive auf. Damit ähneln die Amidsynthetasen beiden Untergruppen der Familie der adenylatbildenden Enzyme (Schmelz & Naismith, 2009; Turgay *et al.*, 1992). Zur Gruppe I (neue Bezeichnung: Unterklasse Ia) gehören die oben beschriebenen A-Domänen der NRPS und zur Gruppe II (neue Bezeichnung: Unterklasse Ib/c) die Acyl- bzw. Aryl-CoA-Synthetasen und Oxidoreduktasen. Die Säuresubstrate der Enzyme der Gruppe II werden ebenfalls durch Adenylierung aktiviert, es kommt jedoch zu keiner kovalenten Thioesterbindung.

Da die prenylierte 4-Hydroxybenzoesäureeinheit von Clorobiocin und Novobiocin für die Bindungsaffinität dieser Antibiotika zur Gyrase eine wichtige Rolle spielt (Lafitte *et al.*, 2002), wurden NovL, CloL und CouL verschiedene Säuresubstrate angeboten mit dem Ziel, Derivate der Aminocoumarinantibiotika herzustellen (Galm *et al.*, 2004a; Schmutz *et al.*, 2003). Dabei zeigten sich unterschiedliche Substratspezifitäten der einzelnen Enzyme und die strukturellen Veränderungen des Säuresubstrats führten zum Teil zu einer erhöhten Aktivitätshemmung der Gyrase (Galm *et al.*, 2004b). Daher bilden die Amidsynthetasen ein wichtiges Werkzeug zur chemoenzymatischen Herstellung neuer Antibiotika.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit war die Strukturaufklärung von FgaPT2, einer Dimethylallyltryptophansynthase aus *Aspergillus fumigatus*, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Stehle. Zu Beginn meiner Arbeit waren die Kristallisationsbedingungen bekannt und erste röntgenspektroskopische Daten lagen vor. Da von keinem ähnlichen Enzym die Struktur bekannt ist, war zur Aufklärung der dreidimensionalen Struktur die Bestimmung der Proteinphasen notwendig.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit mussten daher folgende Experimente durchgeführt werden:

- Heterologe Expression, Reinigung und Kristallisation des FgaPT2-Selenomethionin-Proteins für die Bestimmung der Proteinphasen
- Heterologe Expression, Reinigung und Optimierung der Kristallisation von FgaPT2 für Tränkeexperimente mit Schwermetallatomen für die Bestimmung der Proteinphasen
- Tränkeexperimente mit den Substraten L-Tryptophan und DMAPP bzw. DMASPP (einem nicht-hydrolysierbaren Substratanalogon von DMAPP) zur Herstellung eines Protein-Substrat-Komplexes
- Aufklärung des enzymatischen Katalysemechanismus anhand der dreidimensionalen Struktur

Ein weiterer Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war die röntgenstrukturspektroskopische Untersuchung der Prenyltransferase CloQ sowie Experimente zur ortsgerechten Mutagenese an diesem Enzym, in Kooperation mit Dr. D. Lawson. Zu Beginn meiner Arbeit waren die Kristallisationsbedingungen bekannt und die Struktur von CloQ mit dem kovalent gebundenen Substrat 4-HPP lag vor.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit mussten daher folgende Experimente durchgeführt werden:

- Heterologe Expression, Reinigung und Optimierung der Kristallisation von CloQ für Tränkeexperimente mit den Substraten 4-HPP, DMAPP, L-Tyrosin, DMASPP, GPP und GSPP zur Herstellung eines Protein-Substrat-Komplexes
- Cokristallisation von CloQ mit den Substraten 4-HPP, DMAPP und DMASPP
- Etablierung eines gekoppelten photometrischen Enzymassays
- Biochemische Charakterisierung von CloQ mit den Substraten 4-HPP, DMAPP, L-Tyrosin, *p*-Cumarsäure und GPP
- Ortsgerichtete Mutagenese
- Heterologe Expression und Reinigung der CloQ-Mutanten
- Kristallisation einzelner CloQ-Mutanten
- Bestimmung der spezifischen Aktivität der CloQ-Mutanten
- Erklärung der enzymatischen Katalyse anhand der dreidimensionalen Struktur

Im dritten Projekt sollte versucht werden, die Struktur von einer der Amidsynthetasen NovL, CloL, CouL und SimL in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Stehle aufzuklären.

Es waren folgende Arbeiten durchzuführen:

- Klonierung der Amidsynthetasegene *novL*, *cloL*, *couL* und *simL* in einen Expressionsvektor
- Heterologe Expression, Reinigung und Kristallisation von NovL, CloL, CouL und SimL
- Optimierung der Kristallisation von NovL
- Cokristallisation von NovL mit den Substraten 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure, ATP, AMP-PCP und AMP-PNP
- Heterologe Expression, Reinigung und Kristallisation des NovL-Selenomethionin-Proteins für die Bestimmung der Proteinphasen
- Methylierung von NovL

Schließlich sollten im vierten Projekt durch die Herstellung von chimären Proteinen aus NovL und CouL Sequenzbereiche bestimmt werden, die für die Substraterkennung verantwortlich sind.

Es waren folgende Arbeiten durchzuführen:

- Herstellung chimärer Gene aus *novL* und *couL*
- Klonierung der chimären Gene in einen Expressionsvektor
- Heterologe Expression und Reinigung von zehn Proteinchimären
- Enzymassay mit HPLC-Analyse zur Bestimmung der Aktivitäten der Proteinchimäre

Teile dieser Arbeit wurden unter meiner Anleitung von Frau Silke Fischer (Studentin der Hochschule Esslingen) im Rahmen ihrer Bachelorarbeit durchgeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Gerät	Hersteller
ÄKTA purifier (UPC900, P900, Frac920)	GE Healthcare
Bachofer Vacuum Concentrator™ (SpeedVac)	Bachofer
biostep Dark Hood DH-40/50	Biostep
Blockthermostat BT1302	Scientific Plastics
Circular dichroism spectrometer JASCO J715	Jasco
Dynapro Titan molecular-sizing instrument mit „DYNAMICS“ Softwarepaket	Wyatt Technology
Elektrophorese Power Supply 3000Xi	BioRad
Elektrophorese-Zelle Mini-PROTEAN® 3	BioRad
Gel Electrophoresis Apparatus GNA-100	Pharmacia
HPLC-Anlage 1100 Serie mit VWD bzw. DAD	Agilent
iCycler PCR System	BioRad
LC-MS (Surveyor / TSQ Quantum)	Thermo Finnigan
Mikroskop SZX12	Olympus
Photometer Novaspec II	Pharmacia
Spectrometer Lambda 25 UV/VIS	Perkin Elmer
Spectrophotometer™ NanoDrop 1000	Peqlab Biotechnologie
Schüttler: Cartomat® U / Caromat® HK	B. Braun
Schüttler: Innova® 43	New Brunswick Scientific
Sonifier W-250 D	Branson
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries
Zentrifuge: 2K15	Sigma
Zentrifuge: Multifuge 1 S-R	Heraeus
Zentrifuge: Sorvall® RC 6 plus Rotoren: SLA-3000, SA-300	Thermo
Rigaku MicroMax-007 HF mit mar345dtb (Hausanlage)	Rigaku marResearch
Roboter Freedom Evo 150	Tecan
Rotationsverdampfer Rotavapor-R Pumpe CVC 2000	Büchi Vacuumbrand

Spezielles Ver- und Gebrauchsmaterial

Material	Hersteller
Affinitätssäule HisTrap™ HP (5 mL)	GE Healthcare
Anionenaustauschersäule Resource™ Q (1 mL)	Pharmacia
Gelpermeationssäule HiLoad™ 26/60 Superdex™ 200	Pharmacia
HPLC-Säule Eclipse XDB-C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm)	Agilent
Maisch Reprosil Pur-Basic C18-Säule (250 × 2 mm, 5 µm)	Dr. Maisch
Entsalzungssäule Sephadex™ G-25M PD-10	GE Healthcare
12 µL- <i>microsampling</i> -Küvette	Wyatt Technology
Präzisionsküvetten aus Quarzglas SUPRASIL®	Hellma
Centriprep® Ultracel YM-10 (reg. Cellulose, 10000 MWCO)	Millipore
Ultracel®-10K (reg. Cellulose, 10000 MWCO)	Millipore
24-well-Platten (VDX <i>greased plate</i>)	Hampton Research
96-well-Platten, Intelli-Plate	Robbins Instruments
Deckplättchen: square cover slides OptiClear Plastic™	Hampton Research
<i>cryo loops</i> mit Basis	Hampton Research Molecular Dimensions
Kapillare aus Quarzglas	Hampton Research
DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F ₂₅₄	Merck

Zum Filtrieren von wässrigen Lösungen wurden Spritzenfilter und Filtermembranen aus Celluloseacetat eingesetzt. Zum Filtrieren von Alkoholen und Lösungsmitteln kamen Membranen aus PVDF zum Einsatz.

2.2 Chemikalien, Enzyme und *Kits*

2.2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acetonitril, <i>HPLC grade</i>	Roth
Agar-Agar	Roth
Agarose	Biozym
3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin	Pharmacia & Upjohn
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich
AMP-PCP	Sigma-Aldrich
AMP-PNP	Sigma-Aldrich
ATP	Sigma-Aldrich
Benzamidin Sepharose™	GE Healthcare
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich
BSA	Merck
1,3-Butandiol	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck
Dimethylallylchlorid	Alfa Aesar
3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure	AK Heide (Schmutz <i>et al.</i> , 2003)
DMAB	Sigma-Aldrich
DMAPP	diese Arbeit
DMASPP	Echelon Biosciences
DMSO	Merck
dNTP Mix	Bioline
Dowex AG 50W-X8 100-200-Maschenzahl, H ⁺ -Form	Sigma-Aldrich
DTT	Roth
Ethidiumbromid	Merck
Ethylacetat	Roth
Ethylenglykol	Merck
GPP	AK Heide, I. Unsöld
GSPP	Echelon Biosciences
HEPES	Sigma-Aldrich
4-HPP	Sigma
4-Hydroxy-3-propylbenzoesäure	AK Heide (Galm <i>et al.</i> , 2004a)
Imidazol	Sigma-Aldrich
IPTG	Roth
L-Methionin	Merck
3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonensäure	AK Heide (Schmutz <i>et al.</i> , 2003)

Chemikalie	Hersteller
L(+)-Selenomethionin	Acros
L-Tryptophan	Merck
L-Tyrosin	Merck
Methanol, <i>HPLC Grade</i>	Merck
Molekularsieb 3Å	Merck
MOPSO	Sigma-Aldrich
Natrium-L-Lactat	Sigma-Aldrich
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Novobiocinsäure	Pharmacia & Upjohn
<i>p</i> -Cumarsäure	Sigma-Aldrich
PMSF	Sigma-Aldrich
Pyrophosphatreagenz	Sigma-Aldrich
Rotiphorese [®] Gel 30 (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	Roth
Rotiphenol [®] (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, 25:24:1)	Roth
SelenoMet [™] Medium Base	Molecular Dimensions
SelenoMet [™] Nutrient Mix	Molecular Dimensions
SDS <i>ultrapure</i>	Roth
Sulfosalicylsäure	Sigma-Aldrich
TEMED	Roth
TrisBase (2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propandiol)	Sigma-Aldrich
Tris(tetrabutylammonium)hydrogenpyrophosphat-trihydrat	Sigma-Aldrich
Tween [®] 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	Sigma-Aldrich
Uranyl nitrat	Sigma-Aldrich
Whatman CF11 fibrous cellulose powder	Roth
X-Gal	Roth
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich

Gängige Chemikalien sind hier nicht aufgeführt. Sie wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck, Roth und Sigma-Aldrich in p.a. Qualität bezogen. Bestandteile zur Herstellung von Kulturmedien wurden von den Firmen Difco und Becton-Dickinson verwendet.

2.2.2 Enzyme

Enzym	Hersteller
Lysozym from hen egg white	Sigma-Aldrich
peqGold <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	Peqlab Biotechnologie
PfuTurbo DNA-Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs
RNaseA	Qiagen
T4-DNA-Ligase	New England Biolabs
<i>Taq</i> -DNA Polymerase	New England Biolabs
Thrombin	Sigma-Aldrich
Expand High Fidelity PCR System	Roche Applied Science

2.2.3 Kits

Kit	Hersteller
Additive <i>Screen</i> Kit	Sigma-Aldrich
Crystal <i>Screen</i> (HR2-110)	Hampton
Crystal <i>Screen</i> 2 (HR2-112)	Hampton
Detergent <i>Screen</i> Kit	Sigma-Aldrich
GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	Fermentas
GFX™ PCR and Gel Band Purification <i>Kit</i>	GE Healthcare
JCSG Core Suite I (crystallization <i>screen</i>)	Qiagen
Low Molecular Weight Calibration <i>Kit</i> for SDS Electrophoresis (Proteinmarker)	GE Healthcare
NucleoBond® AX100	Macherey-Nagel
Wizard I random sparse matrix crystallization <i>screen</i>	Emerald BioSystems
Wizard II random sparse matrix crystallization <i>screen</i>	Emerald BioSystems

2.3 Bakterienstämme, Plasmide und *primer*

2.3.1 Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> XL1Blue MRF'	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB</i> ⁺ <i>lacI</i> ^r ZΔM15 Tn10 (Tet ^R)]	Stratagene
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Novagen
<i>E. coli</i> B834(DE3)pLysS	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm met</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Novagen

2.3.2 Plasmide und Cosmide

Plasmid/Cosmid	Beschreibung	Herkunft
pGEM [®] -T	Linearisierter Vektor mit T-Überhang zum direkten Einklonieren von PCR-Produkten mit A-Überhang, <i>lacZα</i> , ori, f1-Origin, Amp ^R	Promega
pHis8	Expressionsvektor für <i>E. coli</i> , Kan ^R , f1-Origin, pBR322-Origin, T7-Promotor, Sequenz für N-terminalen (His) ₈ -tag und C-terminalen (His) ₆ -tag	(Jez <i>et al.</i> , 2000)
pIU18	Expressionskonstrukt für <i>fgaPT2</i> aus <i>A. fumigatus</i> ; 1424 bp <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI Fragment aus pIU17, kloniert in pHis8	(Unsöld, 2006)
pET28a_CloQ	<i>cloQ</i> aus Cosmid K1F2 in pET-28a-c(+) Vektor mit Kan ^R , T7-Promotor und Sequenz für N-terminalen (His) ₆ -tag	(Keller <i>et al.</i> , 2006)
pSH2	1,6 kb <i>Xba</i> I/ <i>Hind</i> III Fragment aus pTLsimLfori in pUWL201 kloniert, trägt <i>simL</i>	(Anderle, 2007)
nov-BG1	von Cosmid 10-9C, <i>bla</i> -Gen durch Kasette von pIJ787 (<i>oriT</i> , <i>tet</i> , <i>attP</i> , <i>int</i> ΦC31) ersetzt, Kan ^R	(Eustáquio <i>et al.</i> , 2005)
clo-BG1	von Cosmid D1A8, <i>bla</i> -Gen durch Kasette von pIJ787 (<i>oriT</i> , <i>tet</i> , <i>attP</i> , <i>int</i> ΦC31) ersetzt, Kan ^R	(Eustáquio <i>et al.</i> , 2005)
couMW12	49F3 (<i>S. risheriensis</i> Cosmid; enthält das 5'-Ende des Coumermycin-A ₁ -Genclusters); Derivat nach Insertion der <i>aac(3)IV/oriT</i> -Kasette; Apra ^R	(Wolpert <i>et al.</i> , 2008)

Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten, relevanten Klonierungs- und Expressionskonstrukte sind im Folgenden aufgeführt.

Plasmid Beschreibung

pUM01	Klonierungskonstrukt für <i>simL</i> ; PCR amplifiziertes Fragment aus pSH2 (1569 bp, <i>primer</i> : <i>simL_His8_f / r</i>), kloniert in pGEM [®] -T
pUM03	Klonierungskonstrukt für <i>novL</i> ; PCR amplifiziertes Fragment aus novBG1 (1600 bp, <i>primer</i> : <i>novL_His8_f / r</i>), kloniert in pGEM [®] -T
pUM05	Expressionskonstrukt für <i>couL</i> ; <i>Bsp</i> HI- <i>Not</i> I-Fragment (1615 bp) aus pUM10, kloniert in pHis8
pUM06	Expressionskonstrukt für <i>simL</i> ; <i>Nco</i> I- <i>Bg</i> II-Fragment (1560 bp) aus pUM01, kloniert in pHis8
pUM07	Expressionskonstrukt für <i>novL</i> ; <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI -Fragment (1590 bp) aus pUM03, kloniert in pHis8
pUM08	Klonierungskonstrukt für <i>cloL</i> ; PCR amplifiziertes Fragment aus cloBG1 (1601 bp, <i>primer</i> : <i>cloL_His8_f / r</i>), kloniert in pGEM [®] -T
pUM09	Expressionskonstrukt für <i>cloL</i> ; <i>Bsp</i> HI- <i>Bg</i> II-Fragment (1591 bp) aus pUM08, kloniert in pHis8
pUM10	Klonierungskonstrukt für <i>couL</i> ; PCR amplifiziertes Fragment aus couMW12 (1607 bp, <i>primer</i> : <i>couL_F_neu</i> und <i>couL_His8_r</i>), kloniert in pGEM [®] -T
pUM18	Klonierungskonstrukt für <i>chimär1</i> ; PCR amplifiziertes Fragment aus pUM05 und pUM07 (1608 bp, <i>primer</i> : siehe Tab. 2.5), kloniert in pGEM [®] -T
pUM20	Klonierungskonstrukt für <i>chimär4</i> ; PCR amplifiziertes Fragment aus pUM05 und pUM07 (1602 bp, <i>primer</i> : siehe Tab. 2.5), kloniert in pGEM [®] -T
pUM21	Klonierungskonstrukt für <i>chimär9</i> ; PCR amplifiziertes Fragment aus pUM05 und pUM07 (1602 bp, <i>primer</i> : siehe Tab. 2.5), kloniert in pGEM [®] -T
pUM22	Klonierungskonstrukt für <i>chimär10</i> ; PCR amplifiziertes Fragment aus pUM05 und pUM07 (1608 bp, <i>primer</i> : siehe Tab. 2.5), kloniert in pGEM [®] -T
pUM23	Klonierungskonstrukt für <i>chimär11</i> ; PCR amplifiziertes Fragment aus pUM05 und pUM07 (1608 bp, <i>primer</i> : siehe Tab. 2.5), kloniert in pGEM [®] -T
pUM24	Expressionskonstrukt für <i>chimär4</i> ; <i>Bsp</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment (1586 bp) aus pUM20, kloniert in pHis8
pUM25	Expressionskonstrukt für <i>chimär10</i> ; <i>Bsp</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment (1592 bp) aus pUM22, kloniert in pHis8
pUM27	Expressionskonstrukt für <i>chimär1</i> ; <i>Bsp</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment (1592 bp) aus pUM18, kloniert in pHis8
pUM28	Expressionskonstrukt für <i>cloQ-C215S</i> ; erhalten durch Mutagenese von pET28a_ <i>CloQ</i> (<i>primer</i> : C215Sf / r)
pUM29	Expressionskonstrukt für <i>cloQ-C215A</i> ; erhalten durch Mutagenese von pET28a_ <i>CloQ</i> (<i>primer</i> : C215Af / r)
pUM30	Expressionskonstrukt für <i>cloQ-F68S</i> ; erhalten durch Mutagenese von pET28a_ <i>CloQ</i> (<i>primer</i> : F68Sf / r)

Plasmid	Beschreibung
pUM31	Expressionskonstrukt für <i>cloQ-R66S</i> ; erhalten durch Mutagenese von pET28a_CloQ (<i>primer</i> : R66Sf / r)
pUM32	Expressionskonstrukt für <i>cloQ-E281G</i> ; erhalten durch Mutagenese von pET28a_CloQ (<i>primer</i> : E281Gf / r)
pUM33	Expressionskonstrukt für <i>cloQ-R66S+F68S</i> ; erhalten durch Mutagenese von pET28a_CloQ (<i>primer</i> : R66SF68Sf / r)
pUM34	Expressionskonstrukt für <i>cloQ-R66S+F68S+E281G</i> ; erhalten durch Mutagenese von pUM32 (<i>primer</i> : R66SF68Sf / r)
pUM35	Expressionskonstrukt für <i>cloQ-R160A</i> ; erhalten durch Mutagenese von pET28a_CloQ (<i>primer</i> : CloQR160A_f / r)
pUM36	Expressionskonstrukt für <i>cloQ-R160Q</i> ; erhalten durch Mutagenese von pET28a_CloQ (<i>primer</i> : CloQR160Q_f / r)
pUM37	Expressionskonstrukt für <i>cloQ-K54S</i> ; erhalten durch Mutagenese von pET28a_CloQ (<i>primer</i> : CloQK54Sneu_f / r)
pUM39	Klonierungskonstrukt für <i>chimär12</i> ; PCR amplifiziertes Fragment aus pUM05 und pUM07 (1608 bp, <i>primer</i> : siehe Tab. 2.5), kloniert in pGEM [®] -T
pUM40	Expressionskonstrukt für <i>chimär12</i> ; <i>Bsp</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment (1592 bp) aus pUM39, kloniert in pHis8
pUM43	Expressionskonstrukt für <i>chimär5</i> ; <i>Bsp</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment (1586 bp) aus pUM45, kloniert in pHis8
pUM44	Expressionskonstrukt für <i>cloQ-E290stop</i> ; erhalten durch Mutagenese von pET28a_CloQ (<i>primer</i> : E290stop_F / R)
pUM45	Klonierungskonstrukt für <i>chimär5</i> ; PCR amplifiziertes Fragment aus pUM05 und pUM07 (1602 bp, <i>primer</i> : siehe Tab. 2.5), kloniert in pGEM [®] -T
pSF01	Klonierungskonstrukt für <i>chimär2</i> ; PCR amplifiziertes Fragment aus pUM05 und pUM07 (1608 bp, <i>primer</i> : siehe Tab. 2.5), kloniert in pGEM [®] -T
pSF03	Klonierungskonstrukt für <i>chimär8</i> ; PCR amplifiziertes Fragment aus pUM05 und pUM07 (1602 bp, <i>primer</i> : siehe Tab. 2.5), kloniert in pGEM [®] -T
pSF04	Expressionskonstrukt für <i>chimär9</i> ; <i>Bsp</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment (1586 bp) aus pUM21, kloniert in pHis8
pSF05	Expressionskonstrukt für <i>chimär11</i> ; <i>Bsp</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment (1592 bp) aus pUM23, kloniert in pHis8
pSF06	Expressionskonstrukt für <i>chimär2</i> ; <i>Bsp</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment (1592 bp) aus pSF01, kloniert in pHis8
pSF07	Expressionskonstrukt für <i>chimär8</i> ; <i>Bsp</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment (1586 bp) aus pSF03, kloniert in pHis8
pSF08	Klonierungskonstrukt für <i>chimär3</i> ; PCR amplifiziertes Fragment aus pUM05 und pUM07 (1602 bp, <i>primer</i> : siehe Tab. 2.5), kloniert in pGEM [®] -T
pSF09	Expressionskonstrukt für <i>chimär3</i> ; <i>Bsp</i> HI- <i>Hind</i> III-Fragment (1586 bp) aus pSF08, kloniert in pHis8

2.3.3 Primer

primer	Sequenz (5'-3')	Plasmid
CloQK54Sneu_f	GGCGCCACCTTATGG AGC ACCACCAGTCAGCCTGG	pUM37
CloQK54Sneu_r	CCAGGCTGACTGGTGGT GCT CCATAAGGTGGCGCC	pUM37
R66Sf*	GATCAACTGTCG TACTCG TTCTTCTCCCGCCTC	pUM31
R66Sr*	GAGGCGGGAGAAGA ACGAG TACGACAGTTGATC	pUM31
F68Sf*	CTGTCGTACCGGTT TCTCC TCCCGCCTCAAGATG	pUM30
F68Sr*	CATCTTGAGGCGGG AGG AGAACCGGTACGACAG	pUM30
R66SF68Sf*	GATCAACTGTCG TACTCG TTCT TCTCC TCCCGCCTC	pUM33+34
R66SF68Sr*	GAGGCGGG AGG AGA ACGAG TACGACAGTTGATC	pUM33+34
CloQR160A_f	GGCCTGGCACACGTC GCG TTCGCAGCGGTGGATTGG	pUM35
CloQR160A_r	CCAATCCACCGCTGCGA ACGCG GACGTGTGCCAGGCC	pUM35
CloQR160Q_f	GGCCTGGCACACGTC CAG TTCGCAGCGGTGGATTGG	pUM36
CloQR160Q_r	CCAATCCACCGCTGCGA ACTGG GACGTGTGCCAGGCC	pUM36
C215Af*	ATGCCCGAGGACTAC GCC GTCGCCATCACCCCTC	pUM29
C215Ar*	GAGGGTGATGGCGAC GCG GTAGTCCTCGGGCAT	pUM29
C215Sf*	ATGCCCGAGGACTACT TCC GTTCGCCATCACCCCTC	pUM28
C215Sr*	GAGGGTGATGGCGAC GAG GTAGTCCTCGGGCAT	pUM28
E281Gf*	GACTACGTCAAGGCC GGC CGCAGCTACACCGGC	pUM32
E281Gr*	GCCGGTGTAGCTGCG GCC GGCCTTGACGTAGTC	pUM32
E290stop_F	CCGGCAACATGGCCT GA ATCCTGGCCGGCTGG	pUM44
E290stop_R	CCAGCCGGCCAGGAT TC AGGCCATGTTGCCGG	pUM44
cloL_F	CTTCATG AGAACAAGGACCACGG	pUM08
cloL_R	TCAGATCT CTCACCTCACCTGTCC	pUM08
couL_F_neu	CTTCATG AGAACAAGGACCACGG	pUM10
couLHis8_r	TCGAATTC CTCACCTCACCTGTCC	pUM10
novLHis8_f	T GGGATCCA ACAAGGATCACGCACC	pUM03
novLHis8_r	TCGAATTC CCCACCTCACCTGTCCA	pUM03
simLHis8_f	GACCATGG AGGCAACGAGCACTACGTCCGG	pUM01
simLHis8_r	GAGATCTC ATTGCGCCATGCGTGGCCTCCCG	pUM01
NovCouMut1f	GTGCTCTACACCAGCGGTACCACCGGTCAACCCAAG GG	pUM21 pSF01
NovCouMut1r	CCCTTGGGTTGACCGGTGGTACCGCTGGTGTAGAGC AC	pUM21 pSF01

primer	Sequenz (5'-3')	Plasmid
NovCouMut2f	CATCCGGCGTCCGGCACGGTGAGCGTCGACGGCCG GCCTG	pUM18 pSF03
NovCouMut2r	CAGGCCGGCCGTCGACGCTCACCGTGCCGGACGCC GGATG	pUM18 pSF03
NovCouMut3f	CGTGCTGCTGCGCGAGAGGTTTCGATCCCGCCGACTT C	pUM20+23
NovCouMut3r	GAAGTCGGCGGGATCGAACCTCTCGCGCAGCAGCA CG	pUM20+23
NovCouMut4af	GACCGCGGTGAGCCACACAGTGGGAATGGTCGTCTG ACATAGCGCTGGCCG	pSF08
NovCouMut4ar	CGGCCAGCGCTATGTCTGACGACCATTCCCCTGTGT GGCTCACCGCGGTC	pSF08
NovCouMut4bf	GACCGCCGTGAGCCAGACAGTCGCGATGATCGTCTG ACACGGTGCTGGCCG	pUM22
NovCouMut4br	CGGCCAGCACCGTGTCTGACGATCATCGCGACTGTCT GGCTCACGGCGGTC	pUM22
NovCouMut5f	CCGTCGACGAACGCGGGTACGTGCGGCTGTTCCGGC CGG	pUM39+45
NovCouMut5r	CCGGCCGAACAGCCGCACGTACCCGCGTTCGTCTGA CGG	pUM39+45
NovCouHindIIIr	GAATGA AAGCTT CTCACCTGTCCACCAGGACGTC	pSF01,03,08 pUM18,45 pUM20- 23,39
NovBspHlf	GGTTCT CATG AACAAGGATCACGCACCGGA	pUM18,20,45 pSF01+08
CouBspHlf	GGTTCT CATG AACAGGGACCACGGGCCGGA	pSF03, pUM21-23 pUM39

Fettgedruckte Buchstaben entsprechen veränderten Basen, die zu den unterstrichenen Restriktionsschnittstellen führten bzw. den Codons, die für die Mutagenese verändert wurden.

Alle Oligonucleotid-*primer* stammen von der Firma Eurofins MWG Operon bzw. die mit (*) markierten *primer* von der Firma Sigma-Aldrich.

2.4 Medien, Puffer und Lösungen

2.4.1 Nährmedien

LB-Medium	NaCl Trypton Hefeextrakt pH 7,0 (NaOH)	10 g/L 10 g/L 5 g/L
LB-Agar	LB-Medium mit Agar-Agar	15 g/L
TB-Medium	Bacto-Trypton Bacto-Hefeextrakt Glycerin KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄ (Phosphatpuffer getrennt autoklaviert)	12 g/L 24 g/L 0,4 % (v/v) 2,31 g/L 12,54 g/L
Medium für SeMet-Protein	SelenoMet™ Medium Base (autoklaviert) SelenoMet™ Nutrient Mix (sterilfiltriert)	21,6 g/L 102 g/L

Die Medien wurden autoklaviert (20 min, 121 °C) und bei 4 °C gelagert. Sterilfiltrierte Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren zugegeben.

Antibiotika

Carbenicillin	50 mg/mL H ₂ O _{bidest.}	50 µg/mL Medium	Roth
Chloramphenicol	25 mg/mL Ethanol	25 µg/mL Medium	Merck
Kanamycin	50 mg/mL H ₂ O _{bidest.}	50 µg/mL Medium	Sigma-Aldrich
Tetracyclin	12,5 mg/mL Ethanol	12,5 µg/mL Medium	Sigma-Aldrich

Die wässrigen Antibiotikalösungen wurden sterilfiltriert (0,2 µm) und bei -20 °C gelagert.

2.4.2 Puffer und Lösungen für die Plasmidpräparation

Lösung 1	Tris-HCl (pH 8,0) EDTA Glucose RNase A (frisch zugegeben)	25 mM 10 mM 50 mM 100 µg/mL
Lösung 2	NaOH SDS	0,2 M 1 % (w/v)
Lösung 3	Kaliumacetat pH 4,8 (Essigsäure)	3 M

Natriumacetat-Lösung	Natriumacetat pH 5,2 (Essigsäure)	3 M
Tris-Puffer	Tris-HCl (pH 8,0)	10 mM

2.4.3 Puffer und Lösungen für die Elektrophorese

Agarosegel-Elektrophorese

50× TAE-Puffer	Tris EDTA pH 8,0 (Essigsäure)	2 M 50 mM
3× DNA-Ladepuffer	Glycerin Bromphenolblau	30 % (v/v) 0,25 % (w/v)
Agarosegel	Agarose in 1x TAE-Puffer	0,8 % (w/v)
Ethidiumbromidlösung	Ethidiumbromid	1 mg/L

SDS-PAGE

10× Elektrophoresepuffer	Tris-HCl (pH 8,3) Glycin SDS	250 mM 1920 mM 1 % (w/v)
Sammelgel 4 % (w/v)	Tris-HCl (pH 6,8) Rotiphorese® Gel 30 SDS TEMED Ammoniumpersulfat	125 mM 4 % (w/v) 0,1 % (w/v) 1 mL/L 0,1 % (w/v)
Trenngel 12 % (w/v)	Tris-HCl (pH 8,8) Rotiphorese® Gel 30 SDS TEMED Ammoniumpersulfat	375 mM 12 % (w/v) 0,1 % (w/v) 1 mL/L 0,1 % (w/v)
4× SDS-Probenpuffer	Tris-HCl (pH 6,8) Glycerin SDS Bromphenolblau β-Mercaptoethanol	250 mM 40 % (v/v) 8 % (w/v) 0,04 % (w/v) 0,2 mL/mL
Fixierlösung	Essigsäure Methanol	100 mL/L 200 mL/L

Färbelösung	Essigsäure	100 mL/L
	Methanol	450 mL/L
	Coomassie Brilliant Blau R-250	0,25 % (w/v)
Entfärbelösung	Essigsäure	100 mL/L
	Methanol	450 mL/L

2.4.4 Puffer und Lösungen für die Proteinreinigung

Lysepuffer	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
	NaCl	500 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	Tween® 20	1 % (v/v)
	Imidazol	20 mM
	β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)	10 mM
	Lysozym (frisch zugegeben)	0,5 mg/mL
	PMSF (frisch zugegeben)	0,5 mM
Waschpuffer	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
	NaCl	500 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	Imidazol	20 mM
	β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)	10 mM
Elutionspuffer	Tris-HCl (pH 8,0)	50 mM
	NaCl	500 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	Imidazol	250 mM
	β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)	10 mM
Dialysepuffer	Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM
	NaCl	100 mM
	β-Mercaptoethanol (frisch zugegeben)	10 mM
Gelpermeationspuffer	Tris-HCl (pH 8,0)	25 mM
	NaCl	100 mM
	DTT (frisch zugegeben)	2 mM
Anionenaustauschpuffer	A Tris-HCl (pH 8,0)	20 mM
	B Tris-HCl (pH 8,0) NaCl	20 mM 1M

Die Puffer zur Proteinreinigung wurden filtriert (0,2 µm) und entgast.

2.4.5 Puffer und Lösungen für die DMAPP-Synthese

Ionenaustauschpuffer	Ammoniumbicarbonat in Isopropanol 2 % (v/v)	25 mM
Chromatographiepuffer	Ammoniumbicarbonat in H ₂ O _{bidest.} /Isopropanol/Acetonitril (1/2/1)	50 mM
Sulfosalicylsäurelösung	Sulfosalicylsäure in Ethanol 60 % (v/v)	10 g/L
Eisenchloridlösung	FeCl ₃ in Ethanol 80 % (v/v)	2 g/L
Kationenaustauscher (4 × 15 cm)	Dowex AG 50W-X8 (100-200-Maschenzahl, H ⁺ -Form)	188 mL
	gewaschen mit NH ₄ (OH)	4x 200 mL
	H ₂ O _{bidest.} → bis pH 7,0 Ionenaustauschpuffer	2x 200 mL
	suspendiert in Säule gepackt Ionenaustauschpuffer	200 mL
Cellulosesäule (5,5 × 18 cm)	Whatman CF11 fibrous cellulose powder	1 L
	gewaschen mit H ₂ O _{bidest.}	700 mL
	HCl (0,1 M)	2x 700 mL
	H ₂ O _{bidest.}	2x 700 mL
	Isopropanol 50 % (v/v)	2x 700 mL
	Säule gepackt	
	gewaschen mit Acetonitril	1,5 L
	Isopropanol 50 % (v/v)	1,5 L
äquilibriert mit Chromatographiepuffer	1,5 L	

2.4.6 Sonstige Puffer und Lösungen

Bradford-Reagenz	Coomassie Brilliant Blue G-250	100 mg/L
	Ethanol 95 % (w/v)	50 mL/L
	H ₃ PO ₄ 85 % (w/v)	100 mL/L
	über einen Faltenfilter filtriert bei 4 °C im Dunkeln gelagert vor Gebrauch auf RT erwärmt	
PBS	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	4,3 mM
	KH ₂ PO ₄	1,4 mM
Phosphatpuffer (20 mM, pH 8,0)	KH ₂ PO ₄ (20 mM)	53 mL/L
	K ₂ HPO ₄ (20 mM)	947 mL/L

2.5 Methoden der Molekularbiologie

2.5.1 Plasmidpräparation und Reinigung von DNA

Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* (Alkalische Lyse)

E. coli-Einzelkolonien wurden über Nacht bei 37 °C und 220 rpm in 3 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Das Pellet aus 1,5 mL Bakterienkultur (Zentrifugation 3300 × *g*, 5 min, 4 °C) wurde in 250 µL Lösung 1 durch Vortexen resuspendiert, mit 250 µL Lösung 2 gemischt und zur Lyse der Zellen einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte durch Zugabe von 250 µL Lösung 3 die Ausfällung eines weißen, flockigen Niederschlages, bestehend aus genomischer DNA und Proteinen. Nach Zentrifugation (21460 × *g*, 20 min, 4 °C) wurde der klare Überstand in ein neues Gefäß überführt. Eine alkoholische Fällung wurde durchgeführt und die DNA in Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 gelöst.

Zur Midipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden die Anionen-Austauscher-Säulen NucleoBond® AX100 verwendet. Die Durchführung erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers mit Übernachtkulturen in 50-100 mL LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum.

Alkoholische DNA-Fällung

Die Fällung von DNA mit Alkoholen diente sowohl zur Konzentrierung als auch zur Reinigung, da bei der Plasmidpāparation Salze und andere niedermolekulare, wasserlösliche Substanzen im Überstand gelöst bleiben. Hierzu kann sowohl Ethanol als auch Isopropanol verwendet werden. In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Fällung stets mit Isopropanol.

Die DNA-Lösung wurde mit 1/10 des Volumens Natriumacetat-Lösung und dem 1-fachen Volumen Isopropanol gemischt. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (21460 × *g*, 20 min, 4 °C) pelletiert, mit 500 µL Ethanol (70 %) gewaschen und nach dem Trocknen bei Raumtemperatur in Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 gelöst.

Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Entfernung von Proteinen aus Nukleinsäurelösungen wurde eine Extraktion mit einer fertigen Mischung von Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, v/v; Rotiphenol®) durchgeführt. Die zu extrahierende Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol versetzt und 1 min kräftig gevortext. Nach Zentrifugation (21460 × *g*, 5-10 min, 4 °C) wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt. Durch eine anschließende DNA-Fällung mit Isopropanol wurden verbliebene Phenolreste aus der Lösung entfernt.

2.5.2 Quantifizierung von DNA

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte durch Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm am NanoDrop 1000 Spectrophotometer™. Hierzu wurden 2 µL Probenvolumen benötigt. Der Extinktionswert von 1,0 entspricht näherungsweise einer Konzentration von 50 µg/mL dsDNA. Damit ergibt sich für die Berechnung der DNA-Konzentration folgende Gleichung:

$$c [\mu\text{g/mL}] = A_{260} \times 50 \mu\text{g/mL}$$

Zur Quantifizierung sehr geringer DNA-Mengen eignete sich die Abschätzung der Bandenintensität im Vergleich zu einem DNA Größenstandard mit bekannten DNA-Mengen pro Bande nach Auftrennung im Agarosegel und Färbung mit Ethidiumbromid.

2.5.3 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung hergestellter Plasmide wurde von der Firma Eurofins MWG Operon mit Hilfe der Didesoxynucleotid-Kettenabbruch-Methode durchgeführt. Hierzu wurde die zu untersuchende DNA-Lösung in einer Konzentration von ca. 100 – 500 ng/µL verschickt. Die Auswertung erfolgte durch einen Sequenzvergleich zwischen der ermittelten und erwarteten DNA-Sequenz mit Hilfe des *online-tools* „ClustalW2“ (European Bioinformatics Institute).

Homologievergleiche auf DNA- und Aminosäureebene wurden mit dem *online-tool* „Basic Local Alignment Search Tool“ (BLAST) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) durchgeführt.

2.5.4 Agarosegel-Elektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte durch horizontale Elektrophorese mit Agarosegelen in einer Standardkonzentration von 0,8 % Agarose in 1× TAE-Puffer. 5 bis 10 µL der zu analysierenden DNA-Proben wurden mit Ladepuffer im Verhältnis 2 zu 1 vermischt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese-Geschwindigkeit betrug 3-5 V/cm. Zur Detektion wurden die Gele nach erfolgter Elektrophorese 15-30 min in einer Ethidiumbromid-Färbelösung gefärbt und mit UV-Durchlicht bei 312 nm analysiert.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten nach gelelektrophoretischer Trennung wurde unter Verwendung des „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kits“ nach Herstellervorschrift durchgeführt.

2.5.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur schnellen und spezifischen *in-vitro*-Vermehrung eines beliebigen DNA-Abschnitts.

Klonierung der Amidsynthetase-Gene

Für die Klonierung von *novL*, *cloL*, *couL* und *simL* wurden zunächst geeignete *primer* am Start- und Stop-Codon des jeweiligen Gens gewählt. Dabei wurde das Leseraster berücksichtigt und für die anschließende Klonierung spezifische Restriktionsstellen in die *primer*-Sequenzen eingeführt. Die PCR wurde mit dem „Expand High Fidelity PCR-System“ gemäß Tab. 2.1 durchgeführt. Die eingesetzten *primer* und *templates* sind der Plasmidliste zu entnehmen (Kap. 2.3.2, pUM01, 03, 08 und 10). Die PCR-Produkte wurden mit dem „GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit“ entsprechend der Herstellervorschrift gereinigt, mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert und mit dem Klonierungsvektor pGEM®-T ligiert.

Tab. 2.1 PCR-Bedingungen für die Amplifikation der Gene *novL*, *cloL*, *couL* und *simL*.

Reagenz	Endkonzentration	Programmschritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
steriles H ₂ O _{bidest.}	ad 50 µL	Denaturierung	94 °C	2 min	1
PCR-Puffer 2 (10-fach)	1-fach	Denaturierung	94 °C	15 s	
DMSO	5 % (v/v)	Anlagerung	67 °C	30 s	10
dNTPs	200 µM	Elongation	72 °C	80 s	
<i>primer</i> (forward + reverse)	je 0,3 µM	Denaturierung	94 °C	15 s	
<i>template</i> DNA	100 ng	Anlagerung	67 °C	30 s	20
		Elongation	72 °C	80 s *	
DNA-Polymerase	2,6 U	Elongation	72 °C	7 min	1

* Die Elongationszeit wurde pro Zyklus um 5 s verlängert.

Herstellung der chimären Gene aus *novL* und *couL*

Zur Herstellung der *novL-couL*-Chimäre wurden vier PCRs durchgeführt. Die Reaktionen 1 und 2 dienten der Amplifikation der zwei zusammensetzenden DNA-Fragmente für das jeweilige Chimär. In Reaktion 3, der Fusions-PCR, wurden die DNA-Fragmente zu einem chimären Gen vereinigt. Hierzu wurden die *primer* für PCR 1 und 2 so gewählt, dass die Sequenzen der PCR-Produkte mit mindestens 35 Basen überlappen. In PCR 4 wurde das PCR-Produkt 3 für die anschließende Klonierung zu einer ausreichenden Menge amplifiziert. Die PCR-Bedingungen und die eingesetzten *primer* und *templates* sind Tab. 2.2 bis Tab. 2.5 zu entnehmen. Aufgrund der 3'→5'-Exonucleaseaktivität der *Pwo*-Polymerase musste für eine Klonierung in pGEM®-T ein 5'A-Überhang an das chimäre Gen angehängt werden. Dies erfolgte durch Zugabe von *Taq*-Polymerase (2,5 U), Reaktionspuffer und dNTPs (200 µM) zu 40 µL PCR-Produkt 4. Für die Reaktion wurde der Ansatz 2 h bei 72 °C inkubiert.

Tab. 2.2 PCR-Bedingungen für PCR 1 und 2.

Reagenz	Endkonzentration	Programmschritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
steriles H ₂ O _{bidest.}	ad 50 µL	Denaturierung	94 °C	2 min	1
PCR-Puffer (10-fach)	1-fach				
DMSO	5 % (v/v)	Denaturierung	94 °C	20 s	20
dNTPs	200 µM	Anlagerung	60 °C	30 s	
<i>primer (forward / reverse)</i>	je 0,4 µM	Elongation	68 °C	1 min	
<i>template</i> DNA	300 ng	Elongation	68 °C	5 min	1
peqGold <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	3 U				

Tab. 2.3 PCR-Bedingungen für PCR 3 (Fusions-PCR).

Reagenz	Endkonzentration	Programmschritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
steriles H ₂ O _{bidest.}	ad 50 µL	Denaturierung	94 °C	3 min	1
PCR-Puffer (10-fach)	1-fach				
DMSO	5 % (v/v)	Denaturierung	94 °C	20 s	15
dNTPs	200 µM	Anlagerung	55 °C	2 min	
PCR-Produkt 1* PCR-Produkt 2*	150 ng	Elongation	68 °C	5 min	
peqGold <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	3 U	Elongation	68 °C	10 min	1

* Die PCR-Produkte 1 und 2 wurden im molaren Verhältnis von 1 zu 1 eingesetzt.

Tab. 2.4 PCR-Bedingungen für PCR 4.

Reagenz	Endkonzentration	Programmschritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
steriles H ₂ O _{bidest.}	ad 50 µL	Denaturierung	94 °C	2 min	1
PCR-Puffer (10-fach)	1-fach				
DMSO	5 % (v/v)	Denaturierung	94 °C	20 s	25
dNTPs	200 µM	Anlagerung	60 °C	30 s	
<i>primer (forward / reverse)</i>	je 0,4 µM	Elongation	68 °C	1,5 min	
PCR-Produkt 3	100 ng	Elongation	68 °C	5 min	1
peqGold <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	3 U				

Tab. 2.5 Eingesetzte *primer* und *templates* für PCR 1 bis 4.

Nr. chimäres Gen	<i>template</i> -DNA PCR 1	<i>primer</i> PCR 1	<i>template</i> -DNA PCR 2	<i>primer</i> PCR 2	<i>primer</i> PCR 4
1	pUM07	NovBspHlf NovCouMut2r	pUM05	NovCouMut2f NovCouHindIIIr	NovBspHlf NovCouHindIIIr
2	pUM07	NovBspHlf NovCouMut1r	pUM05	NovCouMut1f NovCouHindIIIr	NovBspHlf NovCouHindIIIr
3	pUM07	NovBspHlf NovCouMut4ar	pUM05	NovCouMut4af NovCouHindIIIr	NovBspHlf NovCouHindIIIr

Nr. chimäres Gen	<i>template</i> -DNA PCR 1	<i>primer</i> PCR 1	<i>template</i> -DNA PCR 2	<i>primer</i> PCR 2	<i>primer</i> PCR 4
4	pUM07	NovBspHlf NovCouMut3r	pUM05	NovCouMut3f NovCouHindIIIr	NovBspHlf NovCouHindIIIr
5	pUM07	NovBspHlf NovCouMut5r	pUM05	NovCouMut5f NovCouHindIIIr	NovBspHlf NovCouHindIIIr
8	pUM05	CouBspHlf NovCouMut2r	pUM07	NovCouMut2f NovCouHindIIIr	CouBspHlf NovCouHindIIIr
9	pUM05	CouBspHlf NovCouMut1r	pUM07	NovCouMut1f NovCouHindIIIr	CouBspHlf NovCouHindIIIr
10	pUM05	CouBspHlf NovCouMut4br	pUM07	NovCouMut4bf NovCouHindIIIr	CouBspHlf NovCouHindIIIr
11	pUM05	CouBspHlf NovCouMut3r	pUM07	NovCouMut3f NovCouHindIIIr	CouBspHlf NovCouHindIIIr
12	pUM05	CouBspHlf NovCouMut5r	pUM07	NovCouMut5f NovCouHindIIIr	CouBspHlf NovCouHindIIIr

2.5.6 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechte Mutagenese nach der QuikChange™-Methode (Stratagene) beruht auf dem Prinzip der PCR mit einem anschließenden Schneiden der nicht-mutierten methylierten DNA durch die Restriktionsendonuklease *DpnI*.

Bei der Auswahl der *primer* wurden die geforderten Voraussetzungen berücksichtigt: Die *primer* sind 33 bis 36 Basen lang, enthalten an ihren Enden mindestens ein Guanin oder Cytosin, die eingeführte Mutation liegt in der Mitte der *primer* und die Schmelzpunkte der *primer* liegen über 78 °C.

Die PCR wurde gemäß Tab. 2.6 durchgeführt. Die eingesetzten *primer* und *templates* sind der Plasmidliste zu entnehmen (Kap. 2.3.2). Nach Ablauf der PCR wurden zum Ansatz 20 U *DpnI* zugegeben und 2 h bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden 5 µL des Ansatzes für die Transformation von *E. coli* eingesetzt, die Plasmid-DNA isoliert und sequenziert.

Tab. 2.6 PCR-Bedingungen für die ortsgerechte Mutagenese.

Reagenz	Endkonzentration	Programmschritt	Temperatur	Zeit	Zyklus
steriles H ₂ O _{bidest.}	ad 50 µL	Denaturierung	95 °C	30 s	1
PCR-Puffer (10-fach)	1-fach				
DMSO	5 % (v/v)	Denaturierung	95 °C	30 s	
dNTPs	200 µM	Anlagerung	55 °C	1 min	12
<i>primer</i> (forward / reverse)	je 0,4 µM	Elongation	68 °C	8 min	
<i>template</i> DNA	100 ng				
<i>PfuTurbo</i> DNA-Polymerase	2,5 U	Ende	4 °C	-	1

2.5.7 Restriktion und Ligation

Restriktion von DNA

Das Schneiden von DNA mittels Restriktionsendonukleasen dient einerseits zur Analyse isolierter Plasmide und andererseits im präparativen Sinne zur Generierung von zueinander passenden DNA-Enden für eine Ligation.

Analytische Ansätze zum Schneiden von DNA wurden in einem Volumen von 10 μ L mit verschiedenen Restriktionsendonukleasen in den mitgelieferten Reaktionspuffern durchgeführt. Dabei wurden von der zu analysierenden DNA 20 bis 1000 ng und die Enzyme mit einer Aktivität von 5 U pro Ansatz eingesetzt. Abhängig vom Enzym war die Zugabe von BSA entsprechend der Herstellerangaben notwendig. Für die enzymatische Reaktion wurde 1 h bei 37 °C inkubiert.

Präparative Ansätze zum Schneiden von DNA für die anschließende Isolierung bestimmter DNA-Fragmente wurden entsprechend in einem 10-fachen Volumen durchgeführt. Hierbei wurde 2 h bei 37 °C inkubiert.

Ligation von DNA-Molekülen

Bei der Ligation werden die Enden zweier DNA-Fragmente durch die T4-DNA-Ligase kovalent miteinander verknüpft.

Bei der Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit überhängenden Enden wurde in einem Reaktionsvolumen von 10 μ L die T4-DNA-Ligase und der mitgelieferte Reaktionspuffer gemäß den Herstellervorschriften zugegeben und über Nacht bei 16 °C inkubiert. Die zu verknüpfenden DNA-Fragmente wurden in einem molaren Verhältnis von 1 zu 1 und in einer DNA-Gesamtmenge von ca. 50 ng eingesetzt.

5 μ L eines Ligationsansatzes wurden ohne weitere Behandlung direkt zur Transformation von *E. coli* verwendet.

2.5.8 Transformation

Herstellung CaCl₂-kompetenter Zellen

50 mL LB-Medium wurden nach Zugabe des entsprechenden Antibiotikums mit 2 mL einer Übernachtskultur einer *E. coli*-Einzelkolonie des gewünschten Stamms beimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 kultiviert. Das Zellpellet wurde nach Zentrifugation (3041 \times g, 10 min) zweimal in 30 mL eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung gewaschen, 20 min auf Eis inkubiert und erneut abzentrifugiert (3041 \times g, 10 min). Die Zellen wurden vorsichtig in 5 mL eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung mit 15 % (v/v) Glycerin resuspendiert und in 200 μ L-Aliquots bei -70 °C gelagert. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen und bei 4 °C durchgeführt.

CaCl₂-vermittelte Transformation

Bei der Transformation nehmen kompetente Bakterienzellen Fremd-DNA auf. Im Zuge ihrer Vermehrung replizieren sie die eingeführte DNA in entsprechendem Umfang mit.

Pro Transformationsansatz wurden 200 µL CaCl₂-kompetente *E. coli*-Zellen des gewünschten Stamms auf Eis aufgetaut, mit 5 bis 100 ng Plasmid-DNA versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz einer Hitzeschockbehandlung (2 min, 42 °C) unterworfen und unmittelbar darauf einige Minuten auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 mL LB-Medium wurden die Zellen 1h bei 37 °C inkubiert und schließlich auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Blau-Weiß-Selektion

Bei Transformationen mit Klonierungsvektoren, welche ein IPTG induzierbares *lacZ'*-Gen enthielten, wurde eine Blau-Weiß-Selektion zur Detektion rekombinanter Plasmide durchgeführt. Das *lacZ'*-Gen enthält die *multiple cloning site* und codiert für einen Teil der β-Galactosidase, die das Substrat X-Gal spaltet, wobei sich ein Indolfarbstoff bildet, der die Transformanden blau färbt.

Hierzu wurden die antibiotikahaltigen LB-Agarplatten mit einem Gemisch aus 40 µL X-Gal-Lösung (20 mg/mL in DMSO) und 10 µL IPTG-Lösung (80 mg/mL) pro Platte ausplattiert und ca. 30 min getrocknet. Die Transformationsansätze wurden anschließend wie oben beschrieben ausplattiert und inkubiert.

2.6 Proteinpräparation

2.6.1 Heterologe Proteinexpression

Durch ein geeignetes Expressionssystem mit einem starken induzierbaren Promotor können Proteine überexprimiert werden. Beim T7-Expressionssystem wird eine sehr hohe Transkriptionseffizienz durch den T7-Promotor, der von der T7-Phagen-RNA-Polymerase erkannt wird, erreicht. Dieses System ist gekoppelt mit dem IPTG-induzierbaren *lacUV5*-Promotor unter dessen Kontrolle das Gen der T7-Phagen-RNA-Polymerase steht.

Für die Überexpression von FgaPT2, CloQ, CloQ-Mutanten, NovL, CloL, CouL, SimL und der NovL-CouL-Chimäre wurde das jeweilige Expressionskonstrukt mit dem zu exprimierenden Gen in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS transformiert. Mit 35 mL einer Übernachtskultur (LB-Medium mit Kanamycin und Chloramphenicol) aus einer Einzelkolonie wurde 1 L TB-Medium (mit Kanamycin) inokuliert und bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert. Die Induktion erfolgte nach Abkühlung auf 20 °C mit 0,5 mM IPTG bzw. mit 1 mM IPTG für die CloQ-Enzyme. Nach 6 h

Kultivierung bei 20 °C und 250 rpm wurden die Zellen geerntet (2700 × g, 10 min, 4 °C) und bei -20 °C über Nacht eingefroren.

Vor und nach der Induktion wurden für die Analyse mittels SDS-PAGE Proben aus der Kultur entnommen. Um ein vergleichbares Ergebnis zu erzielen wurde das Entnahmevolumen wie folgt berechnet:

$$\text{Probenvolumen } [\mu\text{L}] = 500 \mu\text{L} / \text{OD}_{600}$$

Die Zellen wurden abzentrifugiert (3300 × g, 5 min, 4 °C), in 100 µL Lysepuffer (ohne Imidazol und PMSF) resuspendiert und davon 10 µL analysiert.

Überexpression von SeMet-Proteinen

Die Überexpression der SeMet-Proteine FgaPT2-SeMet und NovL-SeMet erfolgte nach der Vorschrift des Herstellers der Medienbestandteile (Molecular Dimensions) und nach Ramakrishnan *et al.* (1993).

Für die Überexpression der SeMet-Proteine FgaPT2-SeMet und NovL-SeMet wurde das jeweilige Expressionskonstrukt mit dem zu exprimierenden Gen in den *E. coli*-Stamm B834(DE3)pLysS transformiert. Eine Einzelkolonie wurde in 100 mL SeMet-Medium mit L-Methionin (0,04 mg/mL), Kanamycin und Chloramphenicol über Nacht bei 37 °C und 220 rpm kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (3041 × g, 10 min, 4 °C) und dreimal mit jeweils 100 mL H₂O_{steril} gewaschen. Mit dem gewaschenen, in 1 mL H₂O_{steril} resuspendierten Zellpellet wurde 1 L SeMet-Medium mit L-Selenomethionin (0,04 mg/mL) und Kanamycin angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Die Induktion erfolgte nach Abkühlung auf 20 °C mit 1 mM IPTG. Das weitere Vorgehen entsprach der oben beschriebenen Methode.

2.6.2 Proteinreinigung

Die in dieser Arbeit heterolog überexprimierten Proteine enthalten alle einen N-terminalen His-tag, der die Proteinreinigung durch Bindung an Ni-NTA-Agarose ermöglicht.

Alle im Folgenden beschriebenen Schritte erfolgten bei 4 °C. Die nach der Überexpression geernteten Zellen wurden aufgetaut und in 25 mL Lysepuffer pro 10 g Zellen resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (Sonifier W-250D), wobei eine maximale Erwärmung bis 12 °C zugelassen wurde. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (38720 × g, 45 min, 4 °C), der Überstand filtriert (0,45 µm) und auf eine mit Waschpuffer äquilibrierte HisTrapTM HP-Säule aufgetragen. Die immobilisierte Metallchelate-Affinitätschromatographie (IMAC) erfolgte mit Hilfe des ÄKTA *purifiers* entsprechend der Herstellervorschrift zur HisTrapTM HP-Säule mit einem linearen Gradienten von 0 bis 100 % Elutionspuffer in 60 min (Flussrate: 1 mL/min). Im Folgenden wurde abhängig von der Verwendung des Proteins unterschiedlich verfahren.

Reinigung der Proteine für die Kristallisation und für alle CloQ-Mutanten

Die Fraktionen, die das Protein enthielten wurden vereinigt und zur Abspaltung des His-tags mit Thrombin (0,1 U/mg Protein) versetzt. Die Proteinlösung wurde in einen Dialyseschlauch überführt und 15 h bei 4 °C gegen Dialysepuffer dialysiert. Zur Abtrennung des Thrombins und His-tags wurde die Probe über eine Säule mit 1 mL Benzamidin-SepharoseTM und über eine Säule mit 1 mL Ni-NTA-Agarose gegeben. Die Säulen wurden zuvor mit Dialysepuffer äquilibriert, wobei dieser zum Äquilibrieren der Ni-NTA-Agarose-Säule mit Imidazol (20 mM) versetzt wurde, um unspezifische Bindungen des Proteins am Säulenmaterial zu vermeiden. Die Proteinlösung wurde durch Ultrafiltration (Centriprep[®] YM-10) auf ein Volumen von ca. 7 mL eingengt, filtriert (0,2 µm) und auf die mit Gelpermeationspuffer äquilibrierte Gelpermeationssäule SuperdexTM 200 aufgetragen. Die Gelpermeation erfolgte mit dem Gelpermeationspuffer bei einer Flussrate von 1 mL/min. Die Fraktionen, die das gereinigte Protein enthielten wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (Centriprep[®] YM-10) bis zu einer entsprechenden Konzentration (7 bis 20 mg/mL) eingengt. Während des Prozesses des Aufkonzentrierens wurde durch Zugabe von einem Volumen Gelpermeationspuffer ohne NaCl die NaCl-Konzentration auf 50 mM eingestellt. Die Proteinlösung wurde aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Die für CloQ-E290stop zusätzlich angewandte Reinigung über eine Anionenaustauschersäule, die mit Anionenaustauschpuffer A äquilibriert wurde, erfolgte entsprechend der Herstellervorschrift der Säule bei einer Flussrate von 4 mL/min und einem linearen Gradienten von 0 – 50 % Anionenaustauschpuffer B in 5 min und einer finalen Elution bei 100 % Anionenaustauschpuffer B für 1 min.

Für die Analyse mittels SDS-PAGE wurden während der Proteinreinigung an verschiedenen Stellen Proben entnommen.

Reinigung der NovL-CouL-Chimäre

Die Fraktionen, die das Protein enthielten, wurden vereinigt und mittels PD-10 Entsalzungssäulen umgepuffert. Die Säulen wurden mit dem Gelpermeationspuffer äquilibriert, mit 2,5 mL Proteinlösung beladen und das Protein mit 3,5 mL Gelpermeationspuffer wieder eluiert. Nach Zugabe von 15 % (v/v) Glycerin wurde die umgepufferten Proteinlösung aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

2.7 Proteincharakterisierung

2.7.1 Quantifizierung von Proteinen

Proteinbestimmung nach Bradford

Die Konzentration des Gesamtproteins in einer Probe wurde nach M. Bradford bestimmt (Bradford, 1976). Hierzu wurde zunächst mit BSA eine Kalibriergerade mit 3 Messpunkten im Konzentrationsbereich von 0 bis 1 mg/mL erstellt. 20 µL der Kalibrierlösung bzw. der Probe wurden mit 1 mL Bradford-Reagenz vermischt und nach 5 min die Extinktion bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ am Photometer gemessen. Um einen Wert innerhalb der Kalibriergeraden zu erhalten, wurde die Probe bei Bedarf entsprechend verdünnt. Die Konzentration wurde wie folgt berechnet:

$$c_{\text{Protein}} [\text{mg/mL}] = \frac{A_{595\text{nm}}}{m [\text{mL mg}^{-1}]} \times VF$$

c_{Protein}	Proteinkonzentration der Probe
$A_{595\text{nm}}$	Extinktion bei einer Wellenlänge von 595 nm
m	Steigung der Kalibriergeraden: $\Delta A_{595\text{nm}}$ pro 1 mg/mL
VF	Verdünnungsfaktor

Proteinbestimmung bei 280 nm

Die Konzentration von Proben gereinigter Proteine können bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ bestimmt werden. Aromatische Aminosäuren absorbieren Licht bei dieser Wellenlänge und ist der Extinktionskoeffizient des Proteins bekannt, kann aus der Extinktion die Konzentration berechnet werden.

Die Bestimmung des Extinktionskoeffizienten erfolgte über die Aminosäuresequenz mit Hilfe des *online-tools* „ProtParam“ des „ExPASy Proteomics Server“ (Swiss Institute of Bioinformatics). Die Extinktion von 2 µL Probe wurde bei einer Wellenlänge von 280 nm am NanoDrop 1000 SpectrophotometerTM gemessen und die Proteinkonzentration wie folgt berechnet:

$$c_{\text{Protein}} [\text{g/L}] = \frac{A_{280\text{nm}} [\text{cm}^{-1}]}{\varepsilon [\text{L g}^{-1} \text{cm}^{-1}]}$$

c_{Protein}	Proteinkonzentration der Probe
$A_{280\text{nm}}$	Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm pro cm Schichtdicke
ε	„Extinktionskoeffizient“ [L/g/cm]

2.7.2 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Mit der SDS-PAGE wurden die Proteinexpression und der Verlauf der Proteinreinigung dokumentiert. Die Reinheit und der Proteingehalt der jeweiligen Probe sollte damit abgeschätzt werden.

Die diskontinuierliche SDS-PAGE mit Sammel- und Trenngel wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) durchgeführt. Zunächst wurden die zu analysierenden Proben mit dem SDS-Probenpuffer vermischt, wobei dieser mit der

Probe 1 zu 4 verdünnt wurde. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben zur Denaturierung der Proteine 1 min bei 95 °C im Wasserbad erhitzt. Als Sammel- und Trenngel wurden Polyacrylamidgele (4 % und 12 %) verwendet. Die vertikale Elektrophoresekammer wurde mit Elektrophoresepuffer (1-fach konzentriert) befüllt und die Trennung der Proteine bei einer Spannung von 100 V im Sammelgel und 150 V im Trenngel durchgeführt. Die Detektion der Protein erfolgte durch eine Coomassie-Brilliant-Blau-haltige Färbelösung, in der das Gel, nach einer kurzen (ca. 5 min) Behandlung mit Fixierlösung, mindestens 15 min geschwenkt wurde. Schließlich wurde der Hintergrund mit der Entfärbelösung durch Schwenken (ca. 90 min) entfärbt. Das Gel wurde mit H₂O_{bidest.} gewaschen und getrocknet.

2.7.3 Dynamische Lichtstreuung

Mit der dynamischen Lichtstreuung wurde die Reinheit und Homogenität der CloQ-Mutanten in Lösung überprüft. Für die Messung der Probe wurde die zu untersuchende Proteinlösung filtriert (0,1 µm) und luftblasenfrei in eine saubere 12 µL-*microsampling*-Küvette gegeben. Die Messung erfolgte mit dem Dynapro Titan molecular-sizing instrument (Wyatt Technology). Mindestens 15 Messungen wurden aufgenommen und mit dem „DYNAMICS“ Softwarepaket ausgewertet.

2.7.4 Circular dichroismus

Die Konformation der Proteinkette der CloQ-Mutanten sollte mit Hilfe der Circular dichroismus-Spektrometrie analysiert und mit der Konformation des nativen Proteins verglichen werden. Hierzu wurden die Proteinproben durch Ultrafiltration (Ultrafilter[®]-10K) aufkonzentriert und mit Phosphatpuffer (20 mM, pH 8,0) auf eine Konzentration von 0,5 mg/mL eingestellt. Die Messung erfolgte durch einen *scan* im Wellenlängenbereich von 190 bis 260 nm am Circular dichroismus-Spektrometer.

2.7.5 Enzymassays

Abhängig vom zu untersuchenden Enzym und den eingesetzten Substraten wurden die kinetischen Parameter der in dieser Arbeit untersuchten Proteine unterschiedlich bestimmt.

Assay für die DMATS (FgaPT2) mit L-Tryptophan und DMAPP

Der FgaPT2-Assay wurde in einem Reaktionsvolumen von 100 µL in 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) durchgeführt. Der Ansatz enthielt 5 mM CaCl₂, 1 mM L-Tryptophan und 1 mM DMAPP. Nach Zugabe von 2 µg gereinigten Enzyms wurde bei 30 °C 10 min inkubiert und durch Zugabe von 10 µL Trichloressigsäure (1,5 M) die Reaktion abgestoppt. Das Protein wurde durch Zentrifugation (10 min, 21460 × g) abgetrennt.

Der Überstand wurde mittels HPLC auf einer Eclipse XDB-C18 Säule analysiert. Die chromatographische Trennung erfolgte bei einer Flussrate von 1 mL/min und einem Gradienten von 20 – 70 % Acetonitril mit 0,1% Trifluoressigsäure über 20 min gegen H₂O_{bidest.} mit 0,1% Trifluoressigsäure. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 269 nm (Unsöld & Li, 2005).

Assay für CloQ mit 4-HPP/ L-Tyrosin/p-Cumarsäure und DMAPP/GPP

Der Enzymassay für CloQ erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 100 µL in 75 mM Tris-HCl (pH 7,5) (Pojer *et al.*, 2003). Der Ansatz enthielt 2,5 mM MgCl₂, 0,5 mM 4-HPP, L-Tyrosin bzw. p-Cumarsäure und 0,5 mM DMAPP bzw. GPP. Nach Zugabe von gereinigtem Enzym (2 bzw. 16 µg) wurde 10 min bei 30 °C inkubiert und durch Zugabe von 2 µL Ameisensäure die Reaktion abgestoppt. Der Ansatz wurde mit 500 µL Ethylacetat versetzt und 30 s gevortext. Nach Zentrifugation (5 min, 21460 × g) wurde die organische Phase zur Trockene eingedampft, der Rückstand in 100 µL Methanol gelöst, abzentrifugiert (10 min, 21460 × g) und mittels HPLC analysiert. Die chromatographische Trennung erfolgte über eine Eclipse XDB-C18 Säule, bei einer Flussrate von 1 mL/min und einem Gradienten von 20 – 100 % Methanol mit 1 % Ameisensäure über 30 min gegen H₂O_{bidest.} mit 1 % Ameisensäure. Detektiert wurde bei den Wellenlängen 275 nm (Keto-Form von 4-HPP und L-Tyrosin) und 300 nm (Enol-Form von 4-HPP und p-Cumarsäure).

Die gebildeten Produkte C5-prenyliertes L-Tyrosin und C10-prenyliertes 4-HPP wurden zusätzlich mittels LC-MS analysiert (durchgeführt von Stefanie Siebenberg). Die Analyse erfolgte über eine Maisch Reprosil Pur-Basic C18-Säule bei einer Flussrate von 0,2 mL/min, mit ESI und einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer. Die Elektrospannung betrug 4 kV, die Kapillartemperatur 320 °C. Als Trenn- und Hilfsgas wurde Stickstoff verwendet, als Kollisionsgas Argon.

Gekoppelter photometrischer Assay für CloQ

Aufgrund der Keto-Enol-Tautomerie von 4-HPP war die quantitative Auswertung mittels HPLC deutlich erschwert, weshalb die kinetischen Parameter über einen gekoppelten photometrischen Assay bestimmt wurden. Bei diesem Assay wird das bei der Prenylierung freiwerdende Pyrophosphat mit dem Pyrophosphat-Reagenz quantifiziert. Über vier gekoppelte Reaktionen wird das im Reagenz enthaltene NADH+H⁺ zu NAD⁺ oxidiert und die Abnahme von NADH+H⁺ bei einer Wellenlänge von 340 nm detektiert, woraus die Produktbildung pro Zeiteinheit berechnet werden kann. Da pro Mol entstehendem Pyrophosphat 2 Mol NADH+H⁺ oxidiert werden und der molare Extinktionskoeffizient von NADH+H⁺ bei λ = 340 nm 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹ beträgt, ergibt sich für die Berechnung der Produktbildung folgende Gleichung:

$$\text{Produktbildung [mM/min]} = \frac{\Delta A_{340\text{nm}} [\text{min}^{-1} \text{cm}^{-1}]}{2 \times 6,22 [\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}]}$$

$A_{280\text{nm}}$ Extinktionsabnahme bei einer Wellenlänge von 340 nm pro min und pro cm Schichtdicke

Der Assay wurde in einem Reaktionsvolumen von 200 μL in 75 mM Tris-HCl (pH 7,5) durchgeführt. 2,5 mM MgCl_2 , aromatisches und isoprenoides Substrat und 66,7 μL Pyrophosphat-Reagenz (gelöst in 4 mL $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$), wurden 5 min bei 30 °C inkubiert, bevor die Reaktion mit CloQ bzw. einer CloQ-Mutante gestartet wurde. Die Abnahme der $\text{NADH}+\text{H}^+$ -Konzentration wurde über einen Zeitraum von 15 min bei 30 °C detektiert, die Steigung der Kurve bestimmt und die Produktbildung pro Zeiteinheit berechnet. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter wurde zunächst die Abhängigkeit der Produktbildung von der Enzymkonzentration überprüft und die einzusetzende Proteinmenge, die innerhalb des linearen Verlaufs liegen muss, ermittelt. Für die kinetischen Untersuchungen des aromatischen Substrats wurde die Konzentration von DMAPP konstant bei 0,5 mM gehalten und die Reaktion mit 2 μg (für 4-HPP) bzw. 16 μg (für L-Tyrosin und *p*-Cumarsäure) CloQ gestartet. Bei der Bestimmung der kinetischen Parameter für die isoprenoiden Substrate wurde die Konzentration von 4-HPP konstant bei 0,5 mM gehalten und die Reaktion mit 2 μg (für DMAPP) bzw. 16 μg (für GPP) CloQ gestartet. Die spezifische Aktivität der CloQ-Mutanten wurde bei Substratkonzentrationen von 0,5 mM 4-HPP und 0,5 mM DMAPP bzw. GPP bestimmt. Die eingesetzte Enzymmenge wurde entsprechend der gezeigten Aktivität zwischen 5 und 50 μg variiert.

Assay für die Amidsynthetasen und NovL-CouL-Chimäre

Der Assay wurde in einem Reaktionsvolumen von 100 μL in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) durchgeführt. Der Ansatz enthielt 5 mM MgCl_2 , 1 mM ATP, 1 mM Säuresubstrat und 1 mM 3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin (Schmutz *et al.*, 2003). Nach Zugabe von gereinigtem Enzym wurde 15 min bei 30 °C inkubiert und durch Zugabe von 5 μL Trichloressigsäure (1,5 M) die Reaktion abgestoppt. Der Ansatz wurde mit 1 mL Ethylacetat versetzt und 30 s gevortext. Nach Zentrifugation (5 min, 21460 $\times g$) wurde die organische Phase zur Trockene eingedampft, der Rückstand in 100 μL Methanol gelöst, abzentrifugiert (10 min, 21460 $\times g$) und mittels HPLC analysiert. Die chromatographische Trennung erfolgte über eine Eclipse XDB-C18 Säule, bei einer Flussrate von 1 mL/min und einem Gradienten entsprechend Tab. 2.7. Detektiert wurde bei einer Wellenlänge von 330 nm. Als Standard wurde Novobiocinsäure (1 mM) eingesetzt.

Tab. 2.7 Gradient für die HPLC-Analytik der Amidsynthetaseassays.

Zeit	Wasser + 1 % Ameisensäure	Methanol + 1 % Ameisensäure
0	50 %	50 %
2	50 %	50 %
8	40 %	60 %
20	0 %	100 %
23	0 %	100 %
23.1	50 %	50 %
30	50 %	50 %

2.8 Proteinkristalle

2.8.1 Kristallisation von Proteinen

Für die Röntgenstrukturanalyse von Proteinen werden hochgeordnete Einkristalle ausreichender Größe benötigt. Die Kristallisationsbedingungen können nicht vorhergesagt werden, sondern müssen empirisch ermittelt werden.

Die Kristallisation der Proteine wurde mit der *hanging drop* Methode durchgeführt. 24-*well*-Platten wurden mit Kristallisationslösungen befüllt (0,5 mL), zu denen jeweils 1 μ L 1 M DTT-Lösung zupipettiert wurde. Auf einem Deckplättchen wurde zu 1 μ L Reservoir-Lösung 1 μ L Proteinlösung (7 – 20 mg/mL) pipettiert, der Tropfen am Deckplättchen über der Reservoirlösung aufgehängt und das Gefäß luftdicht verschlossen. Die Kristallisation erfolgte bei 4 °C. Die Kristallbildung wurde in regelmäßigen Abständen mit Hilfe des Mikroskops beobachtet.

Als Grundlage für das erste *screening* der Proteine DMATS, NovL, CloL, CouL und SimL mit 2712 verschiedenen Kristallisationsbedingungen diente der „Salk Institute for Biological Studies Chemical Biology Laboratory Crystal Screen I“ dessen Zusammensetzung freundlicherweise von Prof. J. Noel (Salk Institute for Biological Studies) zur Verfügung gestellt wurde.

Für Kristallisationsbedingungen bei denen sich Spherulite, Nadeln oder winzige Kristalle zeigten, wurden Optimierungsversuche durchgeführt: zunächst durch Verfeinerung der Kristallisationsbedingungen, d.h. geringe pH-Abstufungen und Veränderungen in der Präzipitans- und Additiv-Konzentration. Weitere Optimierungsversuche erfolgten durch Variation der Kristallisationstemperatur (8, 12, 16 und 20 °C), der Konzentration der Proteinlösung, des Tropfenvolumens und des Volumenverhältnisses von Proteinlösung zu Reservoirlösung. Außerdem wurden Additive und Detergenzien aus dem „Additiv- und Detergenzscreen“ zugesetzt.

Zur Verbesserung der Kristallqualität wurden die Methoden *microseeding*, *makroseeding* und *streakseeding* eingesetzt. Beim *microseeding* wurden 0,5 μ L eines Tropfens mit vorhandenen Kristallen zu 50 μ L Reservoirlösung gegeben und die Kristalle durch intensives Vortexen mit einer Glasperle zerkleinert. Diese Suspension wurde in verschiedenen Verdünnungen (10 bis 10⁵-fach) der Proteinlösung zugesetzt. Beim *makroseeding* wurde ein bereits gewachsener Kristall in einen neu angesetzten Kristallisationstropfen überführt. Beim *streakseeding* wurde ein Pferdehaar zuerst durch einen Kristallisationstropfen mit vorhandenen Kristallen gezogen und danach durch einen neu angesetzten Kristallisationstropfen.

Weitere Kristallisationsexperimente wurden mit dem Roboter über die *sitting drop* Methode durchgeführt. In die Vertiefungen einer 96-*well*-Platte wurden 80 μ L Reservoirlösung pipettiert. Oberhalb der Reservoirlösung wurde in eine dafür vorgesehene Mulde der Kristallisationstropfen gesetzt (0,3 μ L Reservoirlösung + 0,3 μ L Proteinlösung). Die Platte wurde mit einer Folie luftdicht verschlossen und bei 4 °C bzw. 20 °C inkubiert.

2.8.2 Cokristallisation

Cokristallisation bedeutet die Kristallisation in Anwesenheit eines Substrats oder Substratanalogons. Dies dient einerseits der Darstellung eines Proteins im Zustand mit gebundenem Substrat und andererseits zu einer möglichen Stabilisierung des Proteins, was zu einer Verbesserung der Kristallqualität führen kann.

Bei der Cokristallisation wurden entsprechende Substrate einzeln oder auch mehrere Substrate zusammen der Proteinlösung in einer Konzentration von 1 bis 5 mM zugegeben und diese Mischung zur Kristallisation eingesetzt.

2.8.3 Tränkeexperimente

Diese Experimente dienten dazu, einen Protein-Substrat-Komplex oder Schwermetall-Derivate zu erhalten. Aufgrund des üblicherweise vorhandenen hohen Anteils an Lösungsmittel im Proteinkristall, können Moleküle mit geringer Molekularmasse an spezifische Bindungsstellen im Protein diffundieren. Dies kann durch Tränken von Kristallen in den entsprechenden Lösungen erzielt werden.

Proteinkristalle wurden aus ihrer Mutterlösung entnommen und sukzessive (in drei Schritten) in Lösungen mit steigender Substratkonzentration transferiert, bis der Kristall in einer Lösung mit 5 mM Substrat getränkt werden konnte. Die Verweildauer des Kristalls variierte zwischen 10 min und 20 h. Die Tränklösungen bestanden aus der Reservoirlösung und einem oder mehreren möglichen Substraten.

2.8.4 Methylierung von Proteinen

Bei der Methylierung von Proteinen werden die Lysin-Reste und der N-Terminus methyliert, mit dem Ziel die Kristallisationseigenschaften des Proteins zu verändern (Shaw *et al.*, 2007).

Das zu methylierende Protein wurde in PBS überführt und auf eine Konzentration von 10 mg/mL eingestellt. Je 1 mL dieser Lösung wurde in zwei Reaktionsgefäße (Kontrolle und Methylierung) gefüllt. In das Reaktionsgefäß „Methylierung“ wurden 20 µL DMAB (1 M) und 40 µL Formaldehyd (1 M) pipettiert. Beide Reaktionsgefäße wurden im Dunkeln, bei 4 °C und 100 rpm 2 h geschüttelt. Dieser Prozess wurde zweimal wiederholt. Danach wurden zum Reaktionsgefäß „Methylierung“ 10 µL DMAB (1 M) gegeben und beide Reaktionsgefäße im Dunkeln, bei 4 °C und 100 rpm 12 h geschüttelt. Mit beiden Proteinen (Kontrolle und Methylierung) wurde eine Größenausschlusschromatographie über eine SuperdexTM 200 mit Puffer A durchgeführt. Die entsprechenden Fraktionen wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration (Ultracel[®]-10K) bis zu einer Konzentration von 15 mg/mL eingengt. Pro freie Aminogruppe (Lysine und N-Terminus) sollte das Molekulargewicht der Probe „Methylierung“ im Vergleich zur Kontrolle um 28 Da erhöht sein. Die Proteinlösungen wurden mittels SDS-PAGE analysiert, aliquotiert und bis zur Kristallisation bei -70 °C gelagert.

2.8.5 Montage von Proteinkristallen

Proteinkristalle müssen während der röntgenspektroskopischen Messung aufgrund ihres hohen Solvensgehalts vor dem Dehydrieren geschützt werden. In der Regel wurden die Kristalle bei einer Temperatur um 100 K gemessen. Hierzu wurden die Kristalle mit Hilfe eines *cryo loops* gefischt, im kalten Stickstoffstrom oder flüssigem Stickstoff schockgefroren und über die magnetische Basis des *cryo loops* am Goniometerkopf befestigt oder bis zur Messung in flüssigem Stickstoff gelagert. Vor dem Einfrieren wurden die Kristalle sukzessive (in drei Schritten) von ihrer Mutterlauge in Lösungen mit steigendem Gehalt an *cryo protectant*, das zur Vermeidung von Eiskristallbildung während dem Schockgefrieren dient, transferiert. Als *cryo protectant* (Gefrierschutz) wurden Glycerin bzw. Ethylenglykol in einer Konzentration von 10 bis 25 % der Reservoirolösung bzw. der Tränklösung zugesetzt. In einem Experiment wurden NovL-Kristalle bei Raumtemperatur gemessen und dazu in ihrer Mutterlauge in eine silikonisierte Kapillare aus Quarzglas gebracht. Mit Hilfe von Filterpapier wurde die Mutterlauge aus der Kapillare bis auf einen geringen Rest entfernt und die Kapillare mit Wachs luftdicht verschlossen.

2.8.6 Kristallographische Datensammlung

Die Messungen und die Auswertung wurden ausschließlich von den Kooperationspartnern der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Thilo Stehle und der Arbeitsgruppe von Dr. David Lawson durchgeführt.

Die Datensammlung erfolgte an der Hausanlage (Rigaku) mit einer Kupfer-Drehanode und einem Mar345 Bildplatten-Detektor, an der *beamline* X06SA der *Swiss Light Source* (Villigen, Schweiz), an der *beamline* ID14-4 der *European Synchrotron Radiation Facility* (Grenoble, Frankreich) mit einem Quantum 315r Detektor (Area Detector Systems Corporation) und an der *beamline* I02 der *Diamond Light Source* (Oxfordshire, UK) mit einem ADSC Quantum 315 CCD Detektor.

2.9 Chemische Synthese von DMAPP

Die Synthese von DMAPP wurde in Zusammenarbeit mit Elisa Haug-Schifferdecker nach Woodside *et al.* (1993) durchgeführt.

8,65 g (9,3 mmol) Tris(tetrabutylammonium)hydrogenpyrophosphat-Trihydrat wurden in einen trockenen 100 mL 3-Hals-Rundkolben eingewogen und in 20 mL Acetonitril (getrocknet über Molekularsieb 3 Å) unter Rühren und Stickstoff-Begasung gelöst. 570 µL (4,8 mmol) Dimethylallylchlorid wurden zugegeben und weitere 2 h bei Raumtemperatur unter Stickstoff-Begasung gerührt. Das Lösungsmittel wurde im Rotationsverdampfer (30 °C, 50 mbar) bis zu einer hellgelben zähflüssigen Masse abrotiert. Der Rückstand wurde in 3 mL Ionenaustauschpuffer gelöst, der Rundkolben zweimal mit je 5 mL Ionenaustauschpuffer gewaschen und alle Fraktionen auf einen Kationenaustauscher gegeben. Die Elution erfolgte mit zwei Säulenvolumen Ionenaustauschpuffer bei einer Flussrate von 3 mL/min. Das Eluat wurde in einer Metallschale gesammelt und 5 Tage im Gefriertrockner lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 5 mL Ammoniumbicarbonat (0,05 M) gelöst und mit einem Gemisch aus 10 mL Acetonitril und 10 mL Isopropanol gründlich gevortext. Es bildete sich ein weißes Präzipitat das abzentrifugiert (5 min, 1500 × g) und in 5 mL Ammoniumbicarbonat (0,05 M) suspendiert wurde. Der Überstand wurde in einem Rundkolben gesammelt und die Suspension erneut mit 10 mL Acetonitril und 10 mL Isopropanol gründlich gevortext und zentrifugiert (5 min, 1500 × g). Der Überstand wurde in den Rundkolben überführt und der Rückstand dreimal mit 2 mL Ammoniumbicarbonat (0,05 M), 4 mL Acetonitril und 4 mL Isopropanol extrahiert. Alle Überstände wurden vereinigt, im Rotationsverdampfer (30 °C) auf 5 mL eingengt und bei -20 °C gelagert. Der Extrakt wurde in 5 mL Chromatographiepuffer gelöst, der Kolben dreimal mit 5 mL Chromatographiepuffer gewaschen und alle Fraktionen auf eine Cellulosesäule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit 900 mL Chromatographiepuffer in 30 Fraktionen zu je 30 mL. Jede Fraktion wurde mittels Dünnschichtchromatographie analysiert. Zur Entwicklung wurde Chromatographiepuffer verwendet und detektiert wurde durch Besprühen der DC-Platte mit einer Sulfosalicylsäure-Lösung. Die Platte wurde bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend mit einer Eisen(III)chlorid-Lösung besprüht. Die phosphathaltigen Komponenten erschienen als weiße Flecken auf einem rosafarbenen Hintergrund. Die Fraktionen mit Produkt wurden vereinigt, im Rotationsverdampfer (30 °C) auf ca. 150 mL eingengt und in einer Metallschale über Nacht lyophilisiert. Das Endprodukt (DMAPP als Trisammoniumsalz) wurde gesammelt, luftdicht verschlossen und bei -20 °C gelagert.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Strukturbiologische Untersuchungen zur Dimethylallyltryptophansynthase FgaPT2

Die Dimethylallyltryptophansynthase (DMATS) katalysiert die Prenylierung von L-Tryptophan durch DMAPP und damit den ersten Schritt der Ergotalkaloid-Biosynthese. Obwohl viele Orthologe zu diesem Enzym bekannt sind, lag zu Beginn dieser Arbeit noch keine Kristallstruktur eines Enzyms dieser Gruppe vor. Um Einblicke in die Katalyse der DMATS-Reaktion zu bekommen, wurde die DMATS FgaPT2 aus *Aspergillus fumigatus* exprimiert, gereinigt und kristallisiert. Das Projekt wurde von Dr. Inge Unsöld begonnen und im Rahmen dieser Arbeit zu Ende geführt.

3.1.1 Expression und Reinigung von FgaPT2 und FgaPT2-SeMet

Die ersten Chargen von gereinigtem FgaPT2 wurden von Dr. Inge Unsöld hergestellt. Aufgrund des erhöhten Bedarfs an Protein für Tränkeexperimente wurde im Rahmen dieser Arbeit mit dem Expressionskonstrukt pIU18 eine weitere Charge FgaPT2 exprimiert und anschließend für die Kristallisation mit einer Ausbeute von 18 mg Protein pro 1 L Kultur gereinigt. Mittels SDS-PAGE wurde die erfolgreiche Expression des Proteins durch Induktion (0,5 mM IPTG), die Löslichkeit des Proteins, die Abspaltung des His-tags und die Reinheit des Endproduktes ($c = 15 \text{ mg/mL}$) gezeigt (Abb. 3.1).

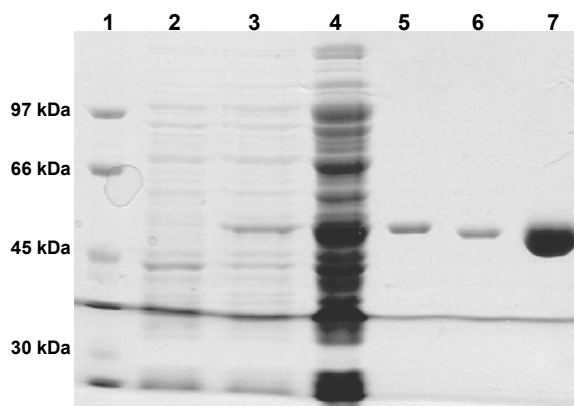


Abb. 3.1 SDS-PAGE zur Expression und Reinigung von FgaPT2. Die berechnete molare Masse von FgaPT2 beträgt 53 kDa. Spur 1: Proteingrößenstandard; Spur 2: Gesamtprotein vor Induktion; Spur 3: Gesamtprotein nach Induktion; Spur 4: lösliches Protein nach Zellaufschluss; Spur 5: Eluat Affinitätschromatographie (1 µg Protein); Spur 6: nach Thrombinspaltung (1 µg Protein); Spur 7: gereinigtes Endprodukt (15 µg Protein).

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration des gereinigten Proteins wurden die „Extinktionskoeffizienten“ $\epsilon_{\text{mit His-tag}} = 1,59 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\epsilon_{\text{ohne His-tag}} = 1,65 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ verwendet.

Die Gewinnung von Phaseninformationen zur Aufklärung einer Struktur kann z.B. durch die direkte Inkorporation von Selen als Selenomethionin, das dann als anomaler Streuer dient, ins Zielprotein erreicht werden. Zur Herstellung eines Selenomethionin-Derivats wurde FgaPT2 in methioninfreiem Medium unter Zusatz von Selenomethionin exprimiert (Expressionskonstrukt: pIU18). Bei der anschließenden Aufreinigung wurde eine Ausbeute von 2,8 mg Protein pro 1 L Kultur erzielt. Mittels SDS-PAGE konnten die erfolgreiche Expression des Proteins durch Induktion (0,5 mM IPTG), die Löslichkeit des Proteins und die Abspaltung des His-tags gezeigt werden (Abb. 3.2). Das Endprodukt FgaPT2-SeMet ($c = 19 \text{ mg/mL}$) wies nur geringe Spuren von Verunreinigungen auf. Über einen Enzymassay mit anschließender HPLC-Analyse wurde die relative Aktivität des Enzyms bestimmt. Bezogen auf die Aktivität von FgaPT2 betrug die relative Aktivität von FgaPT2-SeMet 30 %.

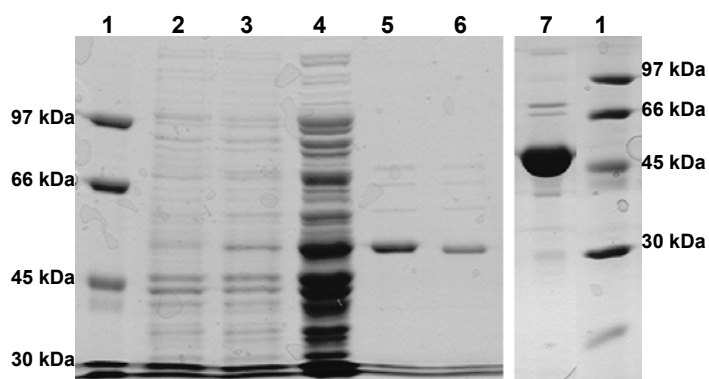


Abb. 3.2 SDS-PAGE zur Expression und Reinigung von FgaPT2-SeMet. Die berechnete molare Masse von FgaPT2-SeMet beträgt 53 kDa. Spur 1: Proteingrößenstandard; Spur 2: Gesamtprotein vor Induktion; Spur 3: Gesamtprotein nach Induktion; Spur 4: lösliches Protein nach Zellaufschluss; Spur 5: Eluat Affinitätschromatographie; Spur 6: nach Thrombinspaltung; Spur 7: gereinigtes Endprodukt (15 μg Protein).

3.1.2 Kristallisation von FgaPT2 und FgaPT2-SeMet

Das initiale *screening* der 2712 verschiedenen Kristallisationsbedingungen erfolgte in Gemeinschaftsarbeit mit Dr. Inge Unsöld. Erste Optimierungen der gefundenen Kristallisationsbedingungen wurden von ihr durchgeführt.

FgaPT2-Kristalle zur Lösung der Struktur und für Tränkeexperimente wurden in einer Kristallisationslösung aus 1,3-Butandiol (26 % v/v), Natrium-L-Lactat (50 mM), MOPSO (100 mM, pH 7,0) und DTT (2 mM) erzeugt. Der Kristallisationstropfen setzte sich aus 2 μL Proteinlösung ($c = 15 \text{ mg/mL}$) und 1 μL Kristallisationslösung zusammen. Die Kristallisation erfolgte bei 4 °C. Die in *clustern* gewachsenen Kristalle (Abb. 3.3) wurden für weitere Experimente vorsichtig auseinander gebrochen und nur die größten, optisch regelmäßig aufgebauten Teilstücke verwendet. Die durchschnittliche Größe der Teilstücke betrug $20 \times 20 \times 200 \mu\text{m}$.

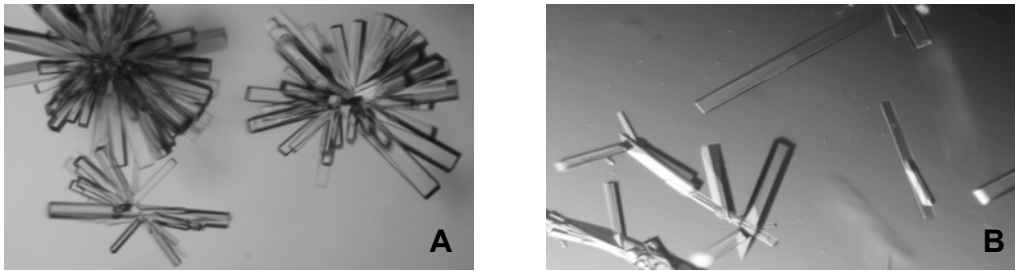


Abb. 3.3 FgaPT2-Kristalle. (A) Kristallcluster; (B) Einzelkristalle nach dem Auseinanderbrechen.

Ein Schwermetall-Derivat wurde durch Tränken der Kristalle in der Kristallisationslösung mit zugesetztem Uranylнитrat (10 mM) für 6 h bei 4 °C von Dr. Georg Zocher generiert.

Der Protein-Substrat-Komplex, bestehend aus FgaPT2 mit den gebundenen Substraten L-Tryptophan und DMASPP (ein nicht-hydrolysierbares Analogon zu DMAPP), wurde durch Tränken der Kristalle in der Kristallisationslösung mit zugesetztem L-Tryptophan (3 mM) und DMASPP (2 mM) für 15 min bei 4 °C erhalten.

In allen Fällen wurde als Gefrierschutz Glycerin (15 – 25 %) eingesetzt.

Die Kristallisationsversuche mit FgaPT2-SeMet wurden auf der Basis der oben genannten Kristallisationsbedingungen durchgeführt. Bei einer 1,3-Butandiol-Konzentration von 25 % (v/v), einem pH-Wert von 7,5 (HEPES 100 mM), dem Zusatz von Natrium-L-Lactat (50 mM) und DTT (2 mM) entstanden durch *streakseeding* Kristalle, die ebenfalls in *clustern* zusammen gewachsen waren. Der Kristallisationstropfen setzte sich aus 2 µL Proteinlösung ($c = 20 \text{ mg/mL}$) und 1 µL Kristallisationslösung zusammen. Die Kristallisation erfolgte bei 4 °C. Die Bruchstücke der *geclusterten* Kristalle waren jedoch zu klein, um auswertbare röntgenspektroskopische Daten zu erhalten.

3.1.3 Strukturlösung von FgaPT2

Die FgaPT2-Kristalle gehören zur Raumgruppe $P2_12_12_1$ und enthalten zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit. Aufgrund der geringen Sequenzhomologie zur einzig strukturell charakterisierten Prenyltransferase NphB wurden die Proteinphasen durch Schwermetallderivatisierung bestimmt. Dazu wurde von Dr. G. Zocher durch Tränkeexperimente ein Uranyl-Derivat des Proteinkristalls hergestellt und die Struktur durch *single-wavelength anomalous dispersion* (SAD) bei einer Auflösung von 2,8 Å bestimmt. Die initial erhaltene Elektronendichte konnte durch *non-crystallographic symmetry averaging* soweit verbessert werden, dass der Modellbau teilweise automatisiert durchgeführt werden konnte. Das derart erhaltene Modell wurde durch

Molekularen Ersatz (*rigid body refinement*) auf die hochaufgelösten Daten (1,76 Å) des FgaPT2-Kristalls übertragen und verfeinert. Die derart erhaltene Struktur des ungebundenen Enzyms diente im Folgenden als Modell für die Struktur des Protein-Substrat-Komplexes, der bis zu einer Auflösung von 2,2 Å bestimmt wurde (Tab. 3.1 und Anhang). Die relevanten Koordinaten und Strukturparameter sind in der RCSB Protein Datenbank unter den Eintragungen 3I4X und 3I4Z abgelegt. Die Aufnahme und Auswertung der Daten zur Strukturlösung von FgaPT2 erfolgte durch Dr. Georg Zocher und Dr. Christoph Schall.

Tab. 3.1 Zusammenstellung der Röntgenstrukturdaten von FgaPT2.

	FgaPT2	Uranylinitrat-Derivat	FgaPT2-Substrat-Komplex
<i>beamline</i>	ESRF ID 14,4	Hausanlage	SLS XDA06
Wellenlänge λ [Å]	0,9395	1,54179	1,2750
Detektor	ADSC Q315r	MAR345	MAR225
Detektorabstand [mm]	276,2	209,6	120,6
Auflösung [Å]	25-1,76 (1,80-1,76)	18,0-2,7 (2,77-2,7)	30,0-2,08 (2,77-2,08)
Zellparameter [Å]	a = 80,1 / b = 98,8 / c = 125,6	a = 80,4 / b = 98,2 / c = 125,0	a = 79,1 / b = 97,9 / c = 125,1
Anzahl Reflexe gemessen	644849 (26434)	536343 (35581)	351025 (24727)
unabhängig	98919 (7030)	52317 (3746)	58992 (4327)
R_{meas} [%]	5,6 (59,1)	14,1 (60,6)	7,3 (54,6)
Vollständigkeit (%)	99,7 (96,8)	99,5 (97,2)	99,9 (100,0)
Multiplizität	6,5 (3,8)	10,3 (9,5)	6,0 (5,7)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	21,1 (2,9)	17,5 (4,6)	17,7 (3,4)
Wilson Factor [Å ²]	30,1	36,1	37,7
Mosaizität [°]	0,15	0,30	0,32

Die Werte in Klammern beziehen sich auf die letzte Auflösungsschale.

3.1.4 Strukturbeschreibung von FgaPT2

Die dreidimensionale Struktur von FgaPT2 (Abb. 3.4) besteht aus einem inneren *barrel*, das aus 10 antiparallelen β -Strängen gebildet wird und von einem Ring aus α -Helices umgeben ist.

Zunächst erinnert diese Faltung an das TIM-*barrel* (α/β -*barrel*), ein weit verbreitetes Strukturprinzip. Doch TIM-*barrels* bestehen aus mehreren (meist acht) parallel angeordneten β -Strängen und sind daher nicht homolog zur FgaPT2-Struktur. Das einzige Protein, das eine strukturelle Ähnlichkeit besitzt, ist das bakterielle Enzym NphB. NphB ist an der Biosynthese des Sekundärstoffmetabolits Naphterpin beteiligt (Kuzuyama *et al.*, 2005) und katalysiert eine aromatische Prenylierung, die der von FgaPT2 ähnelt. Der Vergleich der beiden Strukturen zeigt sehr deutlich, dass beide Proteine eine gemeinsame Architektur besitzen, die bei NphB PT-*barrel* benannt wurde (Kuzuyama *et al.*, 2005). FgaPT2 ist jedoch mit einer Kette aus 459

Aminosäuren deutlich größer als das aus 307 Aminosäuren bestehende NphB. Die zusätzlichen Aminosäuren in FgaPT2 bilden die ausgedehnten *loop*-Regionen und eine zusätzliche α -Helix am N-Terminus des Proteins (vgl. Abb. 3.14). Die C-Termini der beiden Proteine können nicht verglichen werden, da bei FgaPT2 die letzten 30 C-terminalen Aminosäuren aufgrund ihrer Flexibilität strukturell nicht eindeutig dargestellt werden konnten. In einem Monomer der vorhandenen Strukturen deuten diese Aminosäuren eine C-terminale Helix an. Beim Übereinanderlegen der Strukturen von FgaPT2 und NphB, zeigen diese vor allem im Bereich der β -Faltblätter strukturelle Ähnlichkeit.

Im erwähnten TIM-*barrel* ist das Innere des *barrels* gefüllt mit hydrophoben Seitenketten, die zur Stabilität der Faltung beitragen. Die Substratbindung und die Katalyse finden in den *loop*-Regionen des Enzyms statt. Darin unterscheidet sich das PT-*barrel* grundlegend. Sowohl FgaPT2 als auch NphB bilden ein großes Lösungsmittel gefülltes *barrel*, wobei die Substrate jeweils im Zentrum dieses *barrels* gebunden werden (Abb. 3.4). Nahezu alle Aminosäuren, die mit den Substraten interagieren, sind Teil der β -Stränge (Abb. 3.5).

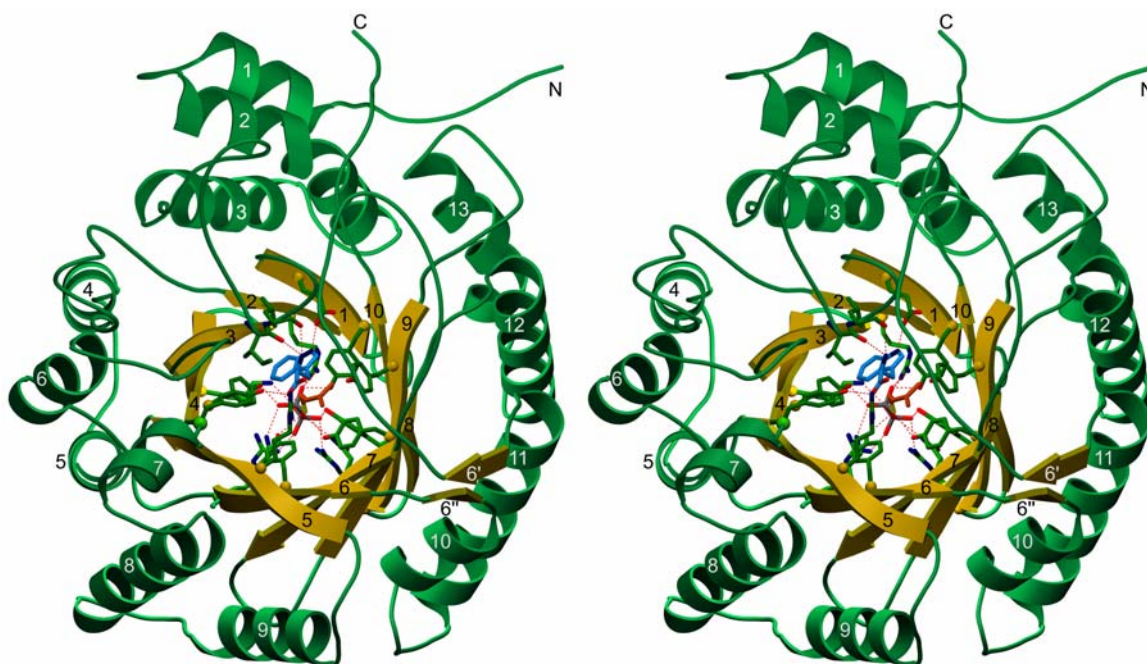


Abb. 3.4 Stereodarstellung der dreidimensionalen Struktur von FgaPT2. Die 10 β -Stränge sind gelb markiert und nummeriert. N und C stehen für den N- bzw. C-Terminus. Die Substrate L-Tryptophan und DMASPP und die Seitenketten (grün), die zu den Substraten Wasserstoffbrücken oder Salzbrücken (gestrichelte rote Linien) ausbilden, sind in der *ball-and-stick*-Darstellung abgebildet: Stickstoff in blau, Sauerstoff in rot, Phosphat in grau, Schwefel in gelb, Kohlenstoff in grün (FgaPT2), in blau (L-Tryptophan) bzw. in orange (DMASPP). (Abb. von Dr. G. Zocher)

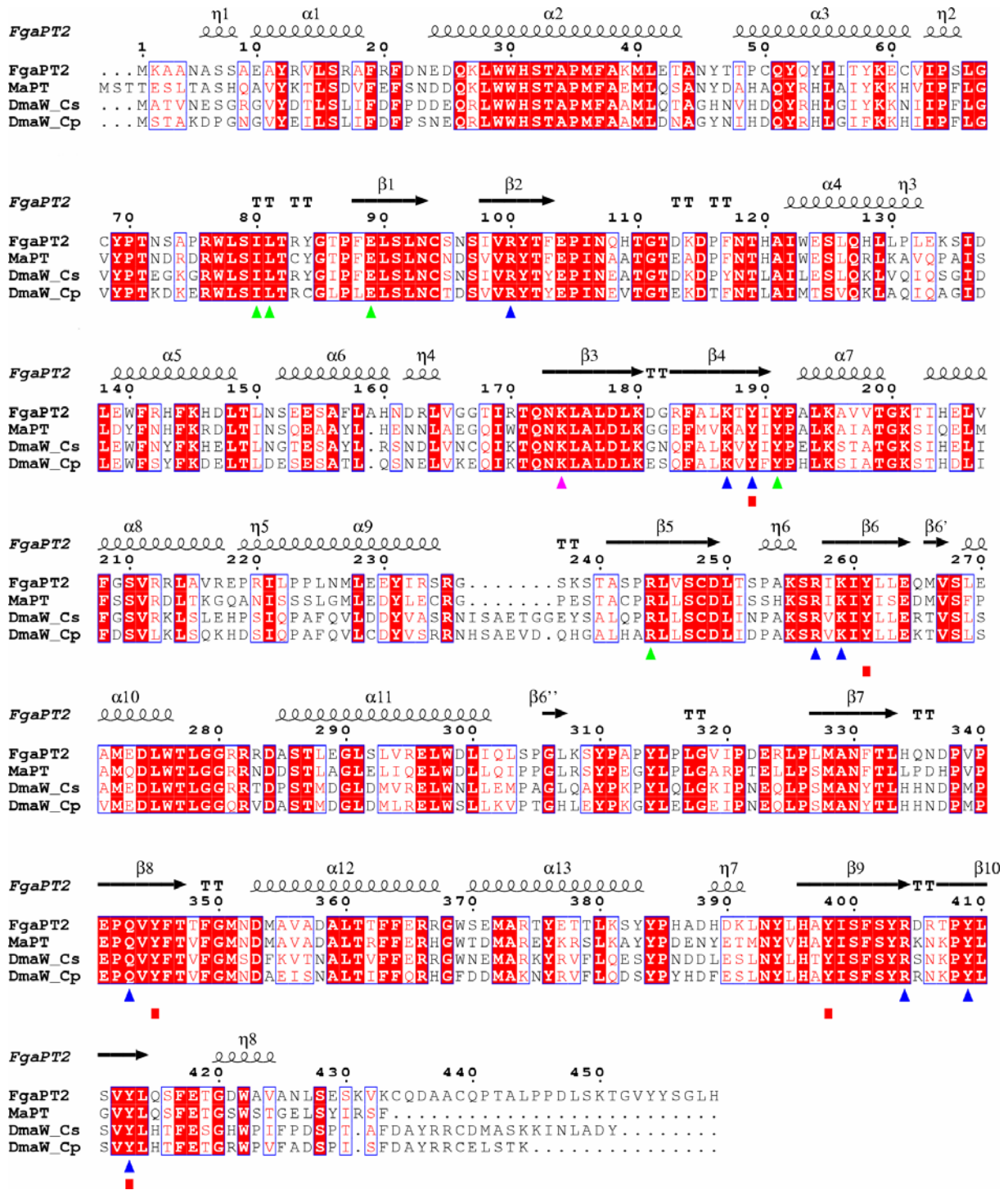


Abb. 3.5 Alignment der DMATS aus Pilzen: FgaPT2, MaPT, DmaW_Cs und DmaW_Cp. Die Aminosäuren von FgaPT2, die an der Koordination der Pyrophosphatgruppe (▲ = R100, K187, Y189, R257, K259, Q343, R404, Y409, Y413), an der Stabilisierung des Allylkations über Kation-π-Interaktionen (■ = Y345) oder durch die Abschirmung des reaktiven Carbokations (■ = Y189, Y261, Y345, Y398, Y413), an der Bindung des aromatischen Substrats L-Tryptophan (▲ = I80, L81, E89, Y191, R244) und an der Abstraktion des Protons vom σ-Komplex (▲ = K174) beteiligt sind, sind mit Symbolen gekennzeichnet. Das alignment wurde mit ESPript 2.2 (Gouet *et al.*, 1999) erstellt. α: α-Helices; η: 3₁₀-Helices; β: β-Stränge; TT: β-Schleifen; weiße Schrift auf rotem Hintergrund: Abschnitte mit Sequenzidentität; Rahmen: Abschnitte mit Sequenzähnlichkeit.

3.1.5 Reaktionsmechanismus der Dimethylallyltryptophansynthase

Bei der Reaktion, die von FgaPT2 bzw. von allen DMATS katalysiert wird, handelt es sich um eine elektrophile Alkylierung eines aromatischen Rings, welche als Friedel-Crafts-Alkylierung bezeichnet wird (Gebler *et al.*, 1992; Silverman, 2002). Die Struktur des FgaPT2-Substrat-Komplexes bietet eine ausgezeichnete Grundlage zum Verständnis des Mechanismus einer enzymatischen Friedel-Crafts-Alkylierung. In der organischen Synthese werden Friedel-Crafts-Alkylierungen üblicherweise mit Alkylhalogeniden durchgeführt. Mit Hilfe von Friedel-Crafts-Katalysatoren, z.B. AlCl_3 , wird die Aktivierungsenergie zur Bildung eines Carbokations aus dem Alkylhalogenid verringert. Bei der enzymatischen Reaktion wird die Aktivierungsenergie für die Bildung des Carbokations aus DMAPP durch starke Interaktionen der Pyrophosphat-Abgangsgruppe mit einer Vielzahl von Aminosäureresten der DMATS herabgesetzt (Abb. 3.6 A). Die positiv geladenen Seitenketten R100, R257, R404, K187 und K259 gleichen die negativen Ladungen der Pyrophosphatgruppe vom gebundenen DMASPP, einem Substratanalogon zu DMAPP, aus. Und die Sauerstoffatome der Pyrophosphatgruppe bilden Wasserstoffbrücken zu den Seitenketten Y189, Y261, Y345, Y409, Y413 und Q343.

Im Vergleich zur Struktur des FgaPT2-Substrat-Komplexes sind in der FgaPT2-Struktur ohne Liganden einige Seitenketten, die mit den Substraten interagieren unterschiedlich positioniert. Sie nehmen also erst in Anwesenheit des Substrats die zur Bindung notwendigen Positionen ein (Abb. 3.6 D).

Das aus DMAPP entstandene planare Carbokation wird durch Kation- π -Interaktionen stabilisiert. In idealer Position befindet sich dazu auf der einen Seite der aromatische Ring des Substrats L-Tryptophan und auf der anderen Seite der aromatische Ring der Y345-Seitenkette. Außerdem muss das reaktive Carbokation vor der Reaktion mit Wasser oder anderen Nukleophilen geschützt werden. Bei der DMATS wird dies durch fünf Tyrosin-Seitenketten (Y189, Y261, Y345, Y398 und Y413) erreicht, die durch ihre Anordnung das reaktive Carbokation vom Lösungsmittel abschirmen.

Die Reaktivität des Indolrings für eine elektrophile Substitution wird vermutlich signifikant durch eine Wasserstoffbrücke zwischen dem indolischen N-H und der Carboxygruppe der Seitenkette E89 verstärkt (Abb. 3.6 C). E89 befindet sich in einer vorwiegend hydrophoben Umgebung. Wie im vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus gezeigt (Abb. 3.7), wird durch diese Wasserstoffbrücke die positive Ladung des intermediären σ -Komplexes reduziert. Diese Funktion von E89 wird durch frühere Arbeiten bestätigt: In einer 1992 durchgeführten biochemischen Untersuchung (Gebler *et al.*, 1992) wurde die Gegenwart einer basischen Seitenkette, die dem indolischen N-H das Proton entziehen kann, vorgeschlagen. In weiteren Arbeiten (Lee *et al.*, 1976; Steffan *et al.*, 2007) wurde außerdem gezeigt, dass sowohl eine Methylierung des indolischen Stickstoffs von L-Tryptophan als auch der Ersatz des Stickstoffs durch ein Schwefelatom, die Prenylierungsreaktion der DMATS dramatisch hemmt bzw. völlig zum Erliegen bringt. Dagegen beeinflussten Methylierungen an den Ringatomen 5, 6 oder 7 die Reaktion wesentlich weniger.

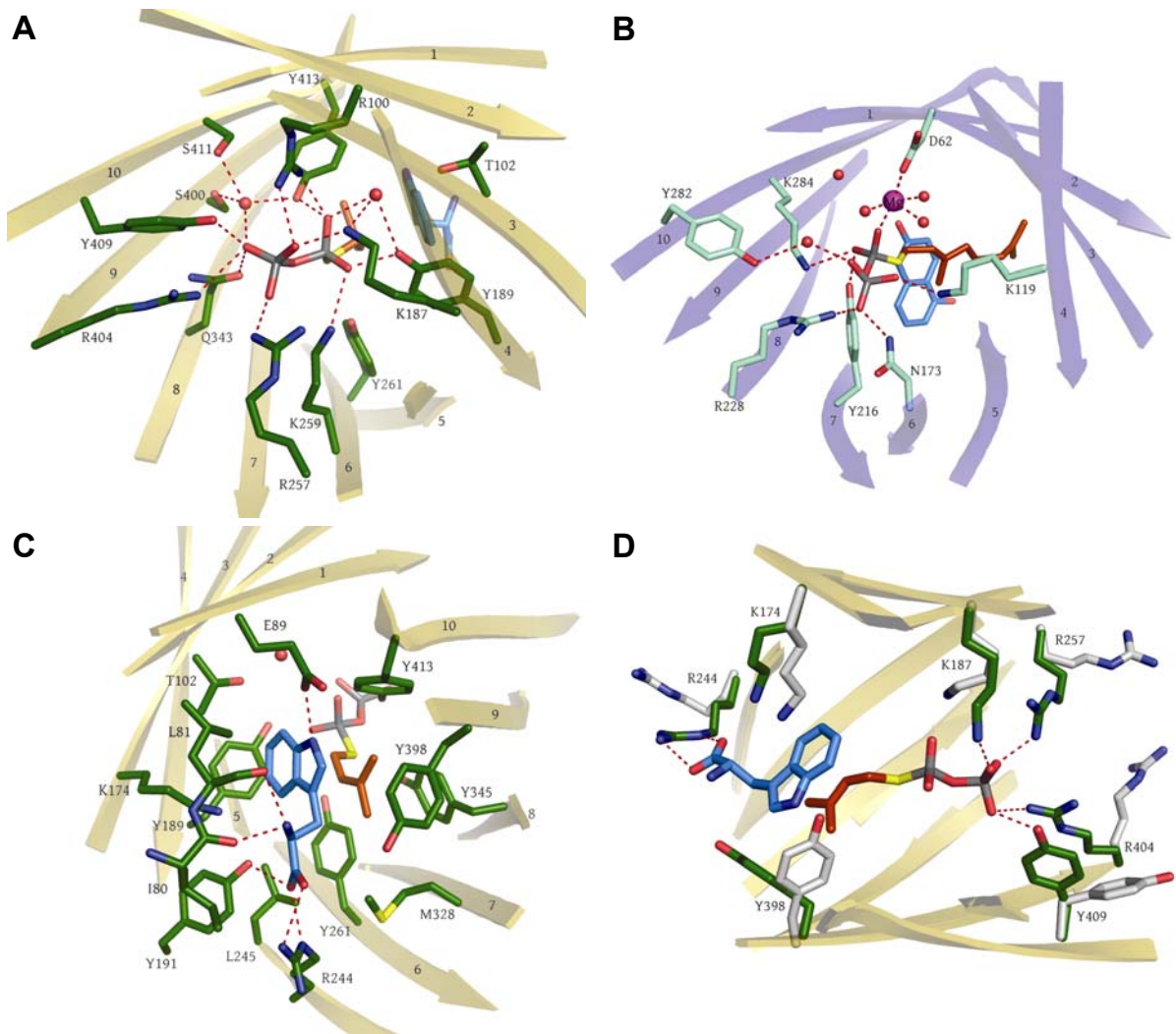


Abb. 3.6 Die aktiven Zentren von FgaPT2 und NphB. (A) DMASPP im aktiven Zentrum von FgaPT2 einschließlich der Seitenketten, die mit der Pyrophosphatgruppe interagieren. (B) GSPP und 1,6-DHN im aktiven Zentrum von NphB einschließlich der Seitenketten, die mit der Pyrophosphatgruppe interagieren. (C) Bindungstasche von L-Tryptophan und der Dimethylallylkette von DMASPP in FgaPT2 einschließlich der Seitenketten, die diese Tasche bilden. (D) Seitenketten im aktiven Zentrum von FgaPT2, die ihre räumliche Orientierung bei der Bindung der Substrate ändern. Die räumliche Orientierung der Seitenketten der ungebundenen Form ist grau gezeigt. Rote gestrichelte Linien zeigen Kontakte zwischen Atomen mit einem Abstand $< 3,2$ Å. (Abb. von Dr. C. Schall)

Die Substrate sind so zueinander angeordnet, dass bei der Reaktion die Pyrophosphatgruppe auf der einen Seite von DMAPP abgespalten wird, während sich die Indoleinheit von der gegenüberliegenden Seite des zurückgebliebenen planaren Dimethylallylkations annähert und von dort die neue Bindung ausgebildet wird. Dies erklärt die Inversion der Konfiguration von C-1 am DMAPP, was durch isotopenmarkierte Vorstufen in einer früheren Untersuchung der DMATS-Reaktion gezeigt wurde (Shibuya *et al.*, 1990).

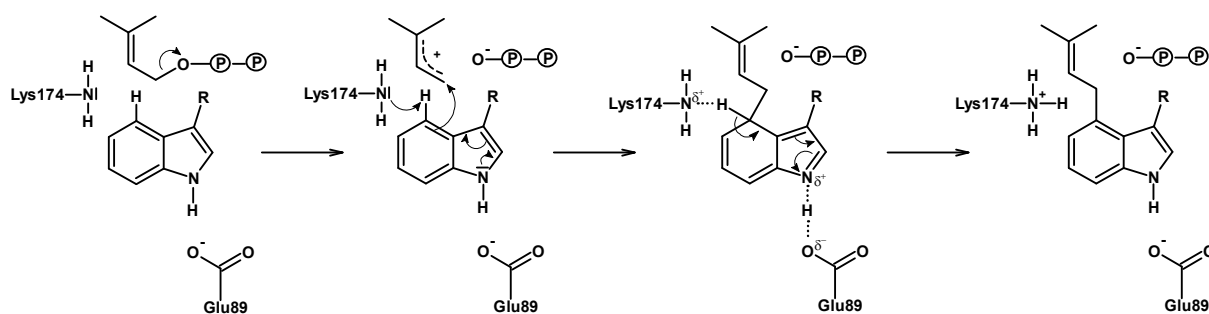


Abb. 3.7 Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für die DMATS.

FgaPT2 prenyliert die Indoleinheit streng regiospezifisch an C-4, wohingegen andere Prenyltransferasen aus Pilzen die Indoleinheit an den Positionen 1, 2, 3 oder 7 prenylieren (Steffan *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2000). Bezüglich ihrer chemischen Reaktivität müssten die Ringatome 2, 5 und 7 die bevorzugten Stellen für eine elektrophile Substitution sein (Lee *et al.*, 1976). Die Anordnung im aktiven Zentrum bietet nun eine Erklärung für die beobachtete Regiospezifität am C-4. Neben der erwähnten Wasserstoffbrücke zwischen dem indolischen N-H und der Carboxygruppe von E89 wird die Position von L-Tryptophan durch weitere Wasserstoffbrücken fixiert. Die Carboxygruppe von L-Tryptophan bildet Wasserstoffbrücken zu den Seitenketten Y191 und R244 und die Aminogruppe zu den Carbonylgruppen von I80 und L81 (Abb. 3.6 C). Die Abstände vom C-1 des Dimethylallylkations zu den Ringatomen 1, 2 und 3 der Indoleinheit liegen zwischen 4,7 und 5,3 Å. Dagegen sind die Abstände zu den Ringatomen 4, 5, 6 und 7 nur 3,5 Å bis 3,9 Å groß, was eine Reaktion an diesen Atomen begünstigt. Im Vergleich dazu wurde bei der Farnesyldiphosphatsynthese ein Abstand von 3,2 Å (zwischen dem C-1 der Dimethylallylgruppe und der C-3–C-4-Doppelbindung des IPP) gemessen (Poulter, 2006) und bei NphB ein Abstand von 4 Å (zwischen dem C-1 von GPP und dem aromatischen Substrat) (Kuzuyama *et al.*, 2005). Diese Autoren postulierten, dass sich die allylische Gruppe, nach Spaltung der C-O-Bindung des isoprenoiden Substrats, von der starr fixierten Pyrophosphatgruppe in Richtung des aromatischen Substrats dreht. Dies könnte auch bei der FgaPT2-Reaktion so ablaufen.

Die bevorzugte Prenylierung am C-4 des Indolrings gegenüber C-7, das eigentlich chemisch reaktiver ist und auch von anderen Indol-Prenyltransferasen aus Pilzen prenyliert wird (Kremer *et al.*, 2007), kann durch sterische Behinderungen im aktiven Zentrum der DMATS erklärt werden. Diese verhindern an C-7, aber auch an C-5 und C-6, die Bildung eines σ -Komplexes mit der Dimethylallylgruppe (Abb. 3.8). Darüber hinaus befindet sich die Aminogruppe der Seitenkette von K174 in idealer Lage, um vom σ -Komplex an C-4 das Proton zu abstrahieren (Abb. 3.6 D und Abb. 3.9).

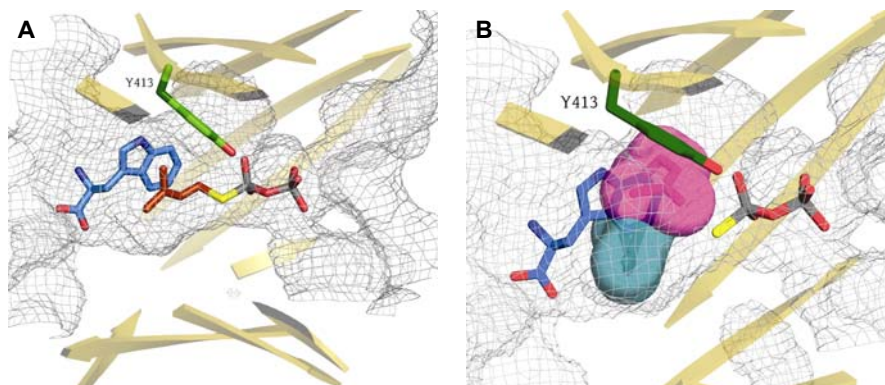


Abb. 3.8 (A) Substratbindestelle von FgaPT2 mit den Substraten L-Tryptophan und DMASPP. (B) Modell für eine Prenylierung von L-Tryptophan an C-4 (blau) und an C-7 (pink), gezeigt im Übergangszustand (σ -Komplex). Die Dimethylallylgruppe an C-4 passt gut in den Bereich der Substratbindestelle, während die gleiche Gruppe – gebunden an C7 – sterisch mit der Seitenkette Y413 kollidieren würde. Gravierende sterische Behinderungen würden bei einer Substitution an C-5 oder C-6 auftreten. (Abb. von Dr. C. Schall)

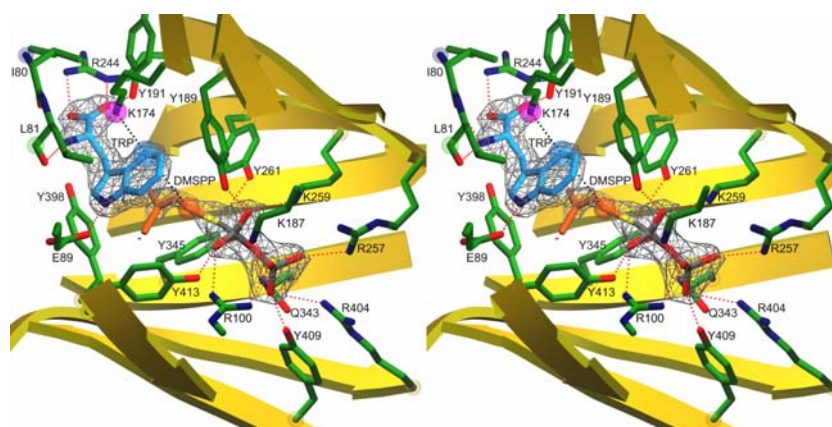


Abb. 3.9 Stereodarstellung des aktiven Zentrums von FgaPT2. Die Differenzelektronendichte ist grau dargestellt, L-Tryptophan blau, DMASPP orange, Wasserstoffbrücken rot, das Reaktionszentrum C-4 von L-Tryptophan als blaue Kugel, das elektrophile C-1 von DMASPP als orange Kugel und die Aminogruppe von K174 als magenta-farbene Kugel. (Abb. von Dr. G. Zocher)

Trans-prenyldiphosphatsynthasen wie die Farnesyldiphosphatsynthase (Poulter, 2006) binden ihr isoprenoides Substrat in Form eines Mg^{2+} -Komplexes. Das Mg^{2+} -Ion wird durch die Sauerstoffatome der Pyrophosphatgruppe und durch eine Aspartat-Seitenkette koordiniert, was die Aktivierungsenergie für die Bildung des Carbokations herabsetzt (Poulter, 2006). Die Aspartat-Seitenkette ist Teil des in Prenyltransferasen vorkommenden (N/D)DxxD-Motivs. Dieses Motiv ist jedoch weder im bakteriellen NphB noch im pilzlichen FgaPT2 zu finden. Allerdings ist die von NphB katalysierte Reaktion trotzdem Mg^{2+} -abhängig, wohingegen die von FgaPT2 katalysierte Reaktion Mg^{2+} -unabhängig ist. Wie die Kristallstruktur von NphB zeigt, wird dort Mg^{2+} durch Wassermoleküle, einem Sauerstoffatom der Pyrophosphatgruppe und der

Carboxygruppe einer Aspartat-Seitenkette komplexiert (Abb. 3.6 B) (Kuzuyama *et al.*, 2005). Durch einen Vergleich der Strukturen von FgaPT2 und NphB wird die ähnliche Lage der Pyrophosphatgruppe in beiden Enzymen deutlich. In FgaPT2 ist jedoch das positiv geladene Mg²⁺-Ion durch die positiv geladene Seitenkette von R100, die vermutlich die Funktion des Mg²⁺-Ions übernimmt, ersetzt.

3.1.6 Dimethylallyltryptophansynthase aus verschiedenen Pilzen

FgaPT2 aus *Aspergillus fumigatus* zeigt zu den DMATS MaPT aus *Malbranchea aurantiaca* (Ding *et al.*, 2008), DmaW-Cs aus Clavicipitaceae (Markert *et al.*, 2008) und DmaW-Cp aus *Claviceps purpurea* P1 (Tudzynski *et al.*, 1999) eine Sequenzähnlichkeit von 64 %, 62 % bzw. 55 %. Alle drei Enzyme katalysieren die gleiche Reaktion wie FgaPT2. Interessanterweise sind alle Aminosäuren, die in die Koordination der Pyrophosphatgruppe, in die Abschirmung des Carbokations, in die Bindung des aromatischen Substrats und in die vermutete Abstraktion des Protons vom σ -Komplex einbezogen sind, in allen vier Enzymen streng konserviert (Abb. 3.5). Daher kann geschlossen werden, dass der vorgeschlagene Reaktionsmechanismus auch für die genannten DMATS-Orthologe gültig ist. In diesem Zusammenhang ist das Enzym DmaW-Cp aus *Claviceps purpurea* P1 von besonderer Relevanz, da dieser Stamm für die industrielle Produktion von Ergotalkaloiden verwendet wird (Schardl *et al.*, 2006).

3.1.7 Mutagenese von FgaPT2

In einer früheren Untersuchung wurden die Aminosäuren K187 und K259 von FgaPT2 zu Glutamat mutiert (Stec *et al.*, 2008). Daraus resultierte eine Reduktion der Enzymaktivität um > 97 %, was die Bedeutung dieser Seitenketten für die Katalyse bestätigt. Die FgaPT2-Struktur zeigt, dass beide Seitenketten in direktem Kontakt mit der Pyrophosphatgruppe stehen (Abb. 3.6 A) und ihr Austausch gegen Glutamat würde die Bindung des Pyrophosphats beeinträchtigen. Die Mutation von R257, das ebenfalls mit der Pyrophosphatgruppe interagiert (Abb. 3.6 A und D), zu Glycin führte zu einem Aktivitätsverlust von > 95 % (Stec *et al.*, 2008). Weitere Mutagenese-Experimente wurden mit dem homologen Enzym MaPT durchgeführt. Die Mutation der Seitenketten T105 und D180 jeweils zu Valin ergab eine Enzymaktivität von nur noch 11 % bzw. 7 % bezogen auf die Enzymaktivität des nicht-mutierten Enzyms (Ding *et al.*, 2008). Die korrespondierenden Aminosäuren in FgaPT2 sind T102 und D178, die beide nicht direkt in die Substratbindung involviert, aber im aktiven Zentrum in der Nähe der Substrate positioniert sind und sich indirekt über Wassermoleküle und andere Seitenketten an der Substratbindung beteiligen.

So könnte ihre Mutation zu Valin zu einer veränderten Anordnung der Seitenketten im aktiven Zentrum führen und die Enzymaktivität beeinträchtigen.

Wie oben beschrieben, spielt R100 in der Koordination des Pyrophosphats eine wichtige Rolle, E89 bei der Delokalisierung der positiven Ladung im Übergangszustand und K174 vermutlich bei der Abstraktion des Protons vom σ -Komplex. Daher wurden von Edyta Stec (Arbeitsgruppe Prof. S.-M. Li, Universität Marburg) folgende Mutationen hergestellt: R100D, R100Q, E89A, K174Q und K174E.

R100D und R100Q führten wie erwartet zu einem Verlust der Enzymaktivität um 95 % bzw. 99,6 %. Mit E89A konnte keine Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden, was die Rolle von E89 im vorgeschlagenen Reaktionsmechanismus bestätigt (Abb. 3.7).

K174Q zeigte eine Reduktion der Enzymaktivität um 60 %. Die Seitenkette von Glutamin kann Wasserstoffbrücken ausbilden, ist aber unter physiologischen Bedingungen nicht ionisierbar und kann daher nicht direkt das Proton vom σ -Komplex abstrahieren. Verglichen mit Lysin ist die Seitenkette von Glutamin um 1 Å kürzer. So könnte ein Wassermolekül diese frei werdende Lücke füllen und die verbliebene Restaktivität von K174Q erklären: Das Wassermolekül würde durch seine Nachbarschaft zur negativ geladenen Carboxygruppe von L-Tryptophan polarisiert werden und damit in der Lage sein, das Proton vom σ -Komplex zu abstrahieren. Durch K174E wird die Enzymaktivität um 97,7 % verringert. Mit Glutamat wird eine zusätzliche negative Ladung eingeführt, was vermutlich strukturelle Veränderungen im aktiven Zentrum auslöst und die starke Reduktion der Enzymaktivität erklärt.

3.1.8 Regiospezifität verschiedener Indol-Prenyltransferasen aus Pilzen

Mehrere Enzyme, die eine Sequenzähnlichkeit zu DMATS aufweisen und eine Prenylierung von L-Tryptophan bzw. eines Derivats von L-Tryptophan mit unterschiedlicher Regiospezifität katalysieren, wurden identifiziert. Dazu gehören die 7-DMATS (Prenylierung an C-7 des Indolrings), FtmPT1 (Prenylierung an C-2 des Indolrings) und FtmPT2 (Prenylierung am N-1 des Indolrings), CdpNPT (reverse Prenylierung an N-1 des Indolrings), FgaPT1 (reverse Prenylierung an C-2 des Indolrings) und AnaPT (reverse Prenylierung an C-3 des Indolrings) (Steffan *et al.*, 2009; Yin *et al.*, 2009). Eine reverse Prenylierung bedeutet eine Reaktion des C-3 der Dimethylallyleinheit mit dem aromatischen Ring.

Mit den genannten Enzymen und FgaPT2 wurden *alignments*, bei denen Sekundärstrukturelemente berücksichtigt wurden, durchgeführt. Die Grundlage für diese *alignments* waren Sekundärstrukturvorhersagen und dreidimensionale Modelle der Enzyme. Die Ergebnisse bestätigten das früher veröffentlichte *alignment* dieser Enzyme (Kremer & Li, 2008) und zeigen die strenge Konservierung der meisten

Seitenketten, die an der Koordination der Pyrophosphatgruppe beteiligt sind. Die entsprechenden Aminosäuren in FgaPT2 sind R100, K187, Y189, R257, K259, Y409 und Y413. Die Schlussfolgerung daraus ist die identische Position der Pyrophosphatgruppe in allen genannten Enzymen. Auch E89 von FgaPT2 ist in allen Enzymen streng konserviert, was darauf hinweist, dass die Interaktion des indolischen N-H mit der Carboxygruppe von E89 für die katalytische Aktivität von allen hier genannten Prenyltransferasen essentiell sein könnte. Des Weiteren sind vier Tyrosine (Y261, Y345, Y189 und Y413), die in FgaPT2 für die Abschirmung des reaktiven Carbokations von Nukleophilen verantwortlich gemacht wurden, in den genannten Enzymen streng konserviert.

Demgegenüber ist K174 wie erwartet in keiner der genannten sechs Indol-Prenyltransferasen konserviert. Dieser Seitenkette wurde eine wichtige Funktion bezüglich der regiospezifischen Prenylierung am C-4 des Indolrings zugeschrieben. Auch die vier Aminosäuren, die in FgaPT2 die Carboxy- und Aminogruppe von L-Tryptophan fixieren, sind in den genannten Indol-Prenyltransferasen nicht konserviert.

So könnten also unterschiedliche Orientierungen des Indolrings im aktiven Zentrum und unterschiedliche Positionen von Seitenketten, die dazu in der Lage sind, das Proton vom intermediären σ -Komplex zu abstrahieren, für die unterschiedlichen Regiospezifitäten der Indol-Prenyltransferasen verantwortlich sein.

3.1.9 Gemeinsame Architektur aromatischer Prenyltransferasen in Bakterien und Pilzen

Wie oben beschrieben, weisen FgaPT2 und das bakterielle Enzym NphB (Kuzuyama *et al.*, 2005) das gleiche, ansonsten bisher unbekanntes Strukturprinzip des PT-*barrels* auf. Zunächst wurde angenommen, dass das PT-*barrel* ein gemeinsames Architekturmerkmal der kleinen Enzymfamilie der ABBA-Prenyltransferasen (Tello *et al.*, 2008), darstellt. ABBA-Prenyltransferasen sind lösliche Enzyme, die aromatische Prenylierungen (Friedel-Crafts-Alkylierungen) katalysieren aber kein für andere Prenyltransferasen typisches (N/D)DxxD-Motiv aufweisen und, mit Ausnahme von NphB, Mg^{2+} -unabhängig sind. In dieser Hinsicht gleichen die Enzyme dieser Familie den bisher untersuchten Indol-Prenyltransferasen aus Pilzen, was bereits bei der Entdeckung des ersten Mitglieds dieser Familie (CloQ) hervorgehoben wurde (Pojer *et al.*, 2003). Allerdings kann keine nennenswerte Sequenzähnlichkeit zwischen den beiden Enzymgruppen festgestellt werden. So zeigt ein *alignment* der Aminosäuresequenzen von FgaPT2 (459 AS) und NphB (307 AS), das die Sekundärstrukturen der beiden Enzyme berücksichtigt, nur 9 % Sequenzidentität und 29 % Sequenzähnlichkeit (vgl. Abb. 3.18). Dies ist ein eindrucksvolles Beispiel für die Konservierung einer dreidimensionalen Struktur von Proteinen mit ähnlicher Funktion

aber stark unterschiedlichen Primärsequenzen in evolutionär entfernten Taxa aus unterschiedlichen Reichen.

Das PT-*barrel* von FgaPT2 und NphB unterscheidet sich grundlegend von der α -helikalen Struktur der Farnesyldiphosphatsynthase (Liang *et al.*, 2002) und der Struktur von *cis*-Polyprenyldiphosphatsynthasen (Guo *et al.*, 2005), die wie FgaPT2 und NphB kein (N/D)DxxD-Motiv aufweisen. Ebenfalls besteht keine Ähnlichkeit zwischen dem PT-*barrel* und den kürzlich vorgestellten Strukturen der membrangebundenen aromatischen Prenyltransferasen UbiA und LePGT1, die die 3-Prenylierung der 4-Hydroxybenzoate katalysieren (Brauer *et al.*, 2008; Ohara *et al.*, 2009). FgaPT2 und NphB bestehen aus zusammengesetzten $\alpha\beta$ -Strukturelementen (vgl. Abb. 3.14), die in der Proteindatenbank bei keinem Protein, von dem sich FgaPT2 und NphB unabhängig voneinander entwickelt haben könnten, wieder zu finden sind. Dies führt zu der Hypothese, dass die gemeinsame Architektur von FgaPT2 und NphB eher aus einem gemeinsamen Ursprung der beiden Enzyme hervorgeht als von einer konvergenten Evolution.

3.2 Strukturbiologische und biochemische Untersuchungen zur aromatischen Prenyltransferase CloQ

Die Struktur der aromatischen Prenyltransferase CloQ aus dem Biosynthesegencluster des Aminocoumarinantibiotikums Clorobiocin in *Streptomyces roseochromogenes*, die die Prenylierung von 4-Hydroxyphenylpyruvat durch DMAPP katalysiert, wurde 2006 von Dr. Sascha Keller untersucht. Es konnten jedoch nur die Ergebnisse zur Kristallisation und die vorläufigen Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse veröffentlicht werden (Keller *et al.*, 2006). Um diese Arbeit zu erweitern, wurden Kristallisationsexperimente, mit denen ein Protein-Substrat-Komplex mit beiden Substraten angestrebt wurde, durchgeführt. Außerdem wurde eine Reihe von Proteinen, bei denen gezielt bestimmte Aminosäuren ausgetauscht wurden, hergestellt. Zwei von diesen CloQ-Mutanten wurden kristallisiert. Schließlich wurden CloQ und die CloQ-Mutanten biochemisch untersucht.

3.2.1 Expression und Reinigung von CloQ

Mit dem Expressionskonstrukt pET28_CloQ (Keller *et al.*, 2006) wurde CloQ exprimiert und anschließend für die Kristallisation mit einer Ausbeute von 8,3 mg Protein pro 1 L Kultur gereinigt. Mittels SDS-PAGE wurde die erfolgreiche Expression des Proteins durch Induktion (1 mM IPTG), die Löslichkeit des Proteins und die Abspaltung des His-tags gezeigt. Das Endprodukt ($c = 8,3 \text{ mg/mL}$) zeigt nur sehr geringe Spuren von Verunreinigungen (Abb. 3.10). Auch die Analyse mittels dynamischer Lichtstreuung ergab, dass es sich um ein reines, monomeres Enzym handelt. Folgende „Extinktionskoeffizienten“ wurden zur Bestimmung der Proteinkonzentration des gereinigten Proteins verwendet:

$\epsilon_{\text{mit His-tag}} = 1,2 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und $\epsilon_{\text{ohne His-tag}} = 1,3 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

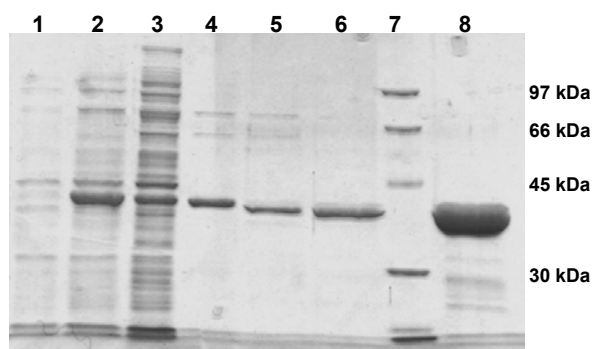


Abb. 3.10 SDS-PAGE zur Expression und Reinigung von CloQ (35,9 kDa). Spur 1: Gesamtprotein vor Induktion; Spur 2: Gesamtprotein nach Induktion; Spur 3: lösliches Protein nach Zellaufschluss; Spur 4: Eluat Affinitätschromatographie (1 µg Protein); Spur 5: nach Thrombinspaltung (1 µg Protein); Spur 6: gereinigtes Endprodukt (1 µg Protein); Spur 7: Proteingrößenstandard; Spur 8: gereinigtes Endprodukt (15 µg Protein).

3.2.2 Mutagenese von CloQ

Die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die katalytische Reaktion sollte durch Mutagenese untersucht werden. Elf CloQ-Proteine mit unterschiedlichen Mutationen wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese hergestellt (Tab. 3.2). Als *template*-DNA wurden pET28_CloQ (Keller *et al.*, 2006) bzw. pUM33 (für das Konstrukt pUM34) eingesetzt und die erhaltenen Konstrukte durch Sequenzierung überprüft. Die mutierten CloQ-Proteine wurden exprimiert und mit einer Ausbeute von bis zu 10 mg Protein pro 1 L Kultur gereinigt (Tab. 3.2). Die Endprodukte zeigen geringe Spuren von Verunreinigungen (Abb. 3.11). Auch die Analyse mittels dynamischer Lichtstreuung zeigte, dass es sich bei den Proteinen um reine, monomere Enzyme handelt. Eine Ausnahme bildet das Protein CloQ-E290stop. Aufgrund der starken Veränderung des Proteins durch die Abspaltung von 37 Aminosäuren am C-Terminus war sowohl die Expression als auch die Reinigung beeinträchtigt. Das Protein musste zusätzlich mittels Anionenaustauschchromatographie aufgereinigt werden. Die verbliebenen Kontaminationen wurden für die nachfolgende Analyse akzeptiert.

Tab. 3.2 Mittels ortsgerichteter Mutagenese hergestellte CloQ-Proteine .

Mutation	Expressions-konstrukt	Ausbeute Protein [mg] pro 1 L Kultur	Proteinkonzentration Endprodukt [mg/mL]
C215S	pUM28	5,0	11,3
C215A	pUM29	3,0	6,7
E281G	pUM32	3,7	12,2
R160A	pUM35	54	9,1
R160Q	pUM36	7,0	3,5
R66S	pUM31	3,3	7,5
K54S	pUM37	40	3,5
E290stop	pUM44	0,2	2,0
F68S	pUM30	5,0	8,3
R66S+F68S	pUM33	4,5	7,2
R66S+F68S+E281G	pUM34	10,0	10,7

Die Proteinkonzentration der gereinigten Proteine wurden bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ unter Verwendung des „Extinktionskoeffizienten“ $\epsilon = 1,3 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bestimmt. Für die Expression der Proteine CloQ-R160A und CloQ-K54S wurden gekaufte kompetente Zellen verwendet, für die anderen selbst hergestellte, jeweils *E. coli* BL21(DE3)pLysS, worauf der Unterschied in der Ausbeute zurückzuführen ist.

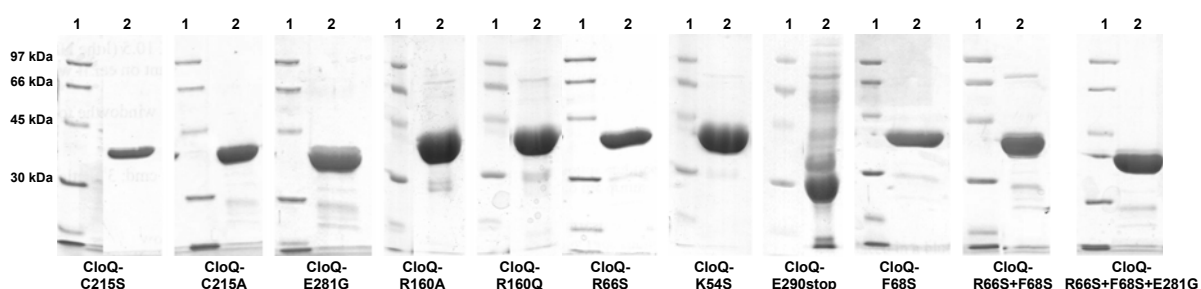


Abb. 3.11 SDS-PAGE zu den gereinigten CloQ-Mutanten. Die erwartete Größe der Proteine beträgt 35,9 kDa. Spur 1: Proteingrößenstandard; Spur 2: gereinigtes Endprodukt (15 μg Protein).

Um eine Veränderung der Proteinfaltung durch die eingeführten Mutationen auszuschließen, wurden die Circular dichroismus-Spektren der Proteine CloQ-R66S, CloQ-F68S, CloQ-C215S, CloQ-C215A, CloQ-E281G, CloQ-R66S+F68S und CloQ-R66S+F68S+E281G mit dem Wildtyp-Protein (WT-CloQ) verglichen. Alle Spektren zeigen den gleichen Verlauf (Abb. 3.12), was die unveränderte Proteinfaltung belegt.

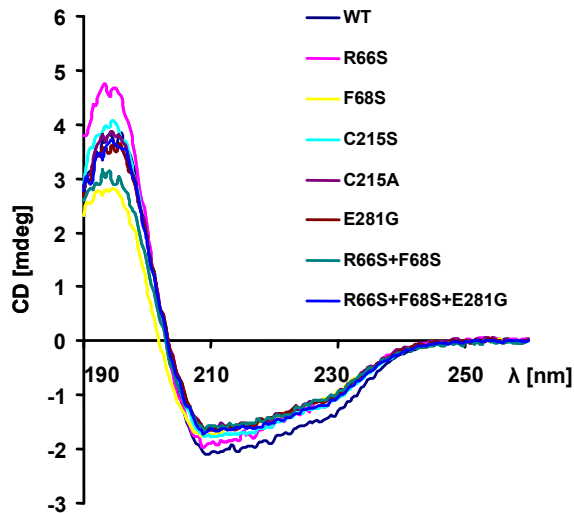


Abb. 3.12 Circular dichroismus-Spektren von CloQ (WT) und der CloQ-Mutanten. Die Spektren wurden im Wellenlängenbereich 250 bis 190 nm aufgenommen.

3.2.3 Kristallisation von CloQ, CloQ-C215S und CloQ-R66S

Die Kristallisation erfolgte bei 20 °C mit 2 µL Proteinlösung ($c = 8,3 \text{ mg/mL}$) und 2 µL Kristallisationslösung (3,0 M Natriumformiat, 100 mM HEPES pH 6,5 und 2 mM DTT). Die Kristalle (Abb. 3.13) erreichten dabei eine durchschnittliche Größe von $200 \times 200 \times 50 \text{ µm}$. Für einen Protein-Substrat-Komplex bestehend aus 4-HPP und DMAPP oder DMASPP wurden zahlreiche Tränkeexperimente und Cokristallisationen durchgeführt. Neben 4-HPP, DMAPP und DMASPP wurden auch die Substrate L-Tyrosin, GPP und GSPP mit und ohne Zusatz von Mg^{2+} getestet. Dabei betrug die Substratkonzentration jeweils 5 mM. In keinem der Experimente gelang es, neben 4-HPP auch das isoprenoide Substrat gebunden im Protein darzustellen.

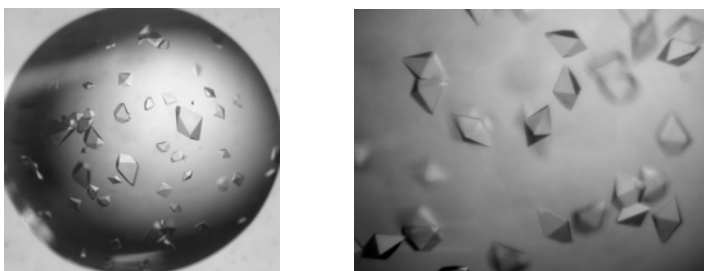


Abb. 3.13 CloQ-Kristalle.

CloQ-R66S und CloQ-C215S wurden bei 20 °C mit 2 µL Proteinlösung ($C_{\text{CloQ-R66S}} = 7,5 \text{ mg/mL}$; $C_{\text{CloQ-C215S}} = 11,3 \text{ mg/mL}$) und 2 µL Kristallisationslösung (CloQ-R66S: 2,92 M Natriumformiat, 100 mM HEPES pH 6,25 und 2 mM DTT; CloQ-C215S: 2,92 M Natriumformiat, 100 mM HEPES pH 6,5 und 2 mM DTT) kristallisiert. Beide Kristalle wurden Tränkeexperimenten mit 5 mM 4-HPP ausgesetzt und nur bei CloQ-R66S konnte im Protein gebundenes 4-HPP nachgewiesen werden. In allen Fällen wurde als Gefrierschutz Ethylenglykol (25 %) eingesetzt.

3.2.4 Strukturlösung von CloQ, CloQ-C215S und CloQ-R66S

Die Struktur von CloQ mit dem gebundenen Substrat 4-HPP wurde mit einer Auflösung von 2,2 Å bestimmt (genannt WT-4HPP-Struktur). Das Protein wurde ursprünglich in Anwesenheit des aromatischen Substrats (2 mM in allen Puffern) gereinigt und kristallisiert (Keller *et al.*, 2006). Spätere Reinigungen wurden ohne 4-HPP durchgeführt und auch die Kristallisation erfolgte ohne Zusatz von 4-HPP. Ein weiterer CloQ-Substrat-Komplex wurde stattdessen durch Tränkeexperimente mit 4-HPP (5 mM) hergestellt. Dies ergab eine zur WT-4HPP-Struktur identische Struktur, allerdings mit einer Auflösung von 2,5 Å und wurde daher nicht validiert. Zur Bestimmung der Proteinphasen wurden von Dr. S. Keller durch Tränkeexperimente Iodid-Derivate hergestellt und die Struktur mit Hilfe der SIRAS-Methode (*single isomorphous replacement* und anomaler Streuung) gelöst (Tab. 3.3 und Anhang). Diese Struktur diente als Modell für drei weitere CloQ-Strukturen. Die erste Struktur, Apo-Struktur, enthält keine Substrate. Das Enzym wurde ohne Zugabe von 4-HPP gereinigt und kristallisiert. Aufgrund der schlechteren Kristallisierbarkeit des Proteins in Abwesenheit von 4-HPP, konnte die Struktur nur mit einer Auflösung von 3,1 Å bestimmt werden (Tab. 3.3 und Anhang). Außerdem wurden die Strukturen von zwei mutierten CloQ-Proteinen bestimmt (R66S-4HPP und C215S). R66 wurde zu Serin mutiert unter der Annahme, dass R66 eine wichtige Rolle bei der Bindung des isoprenoiden Substrats DMAPP spielt. C215 wurde zu Serin mutiert, da C215 mit dem aromatischen Substrat 4-HPP interagiert. Die Strukturen der zwei mutierten Enzyme CloQ-C215S und CloQ-R66S zeigen eine Auflösung von 1,85 Å und 2,22 Å (Tab. 3.3 und Anhang). Beide Enzyme wurden ohne Zusatz von 4-HPP gereinigt und kristallisiert, die Kristalle jedoch Tränkeexperimenten mit 4-HPP (5 mM) ausgesetzt. Alle gemessenen CloQ-Kristalle gehören zur Raumgruppe $I4_122$.

Die relevanten Koordinaten und Strukturdaten werden mit Einreichen der Publikation in der RCSB Protein Datenbank abgelegt. Die Strukturlösung der vier CloQ-Strukturen erfolgte durch Dr. David Lawson.

Tab. 3.3 Zusammenstellung der Röntgenstrukturdaten von CloQ

	WT-4HPP native	WT-4HPP Iodid-Derivat	Apo	C215S	R66S-4HPP
<i>beamline</i>	Hausanlage	Hausanlage	Hausanlage	DLS I02	DLS I02
Wellenlänge λ [Å]	1,542	1,542	1,542	0,980	0,951
Auflösung [Å]	31,86-2,21 (2,33-2,21)	30,98-2,43 (2,56-2,43)	23,24-3,10 (3,27-3,10)	44,09-1,85 (1,95-1,85)	51,57-2,22 (2,34-2,22)
Zellparameter [Å]	a=b=135,19 c=98,13	a=b=134,31 c=100,30	a=b=135,57 c=95,70	a=b=135,45 c=99,34	a=b=135,34 c=98,64
Anzahl Reflexe (unabh.)	22556 (2718)	17159 (2090)	8365 (1208)	39516 (5683)	23029 (3323)
R_{merge}	0,084 (0,301)	0,120 (0,322)	0,138 (0,285)	0,092 (0,541)	0,101 (0,617)
Vollständigkeit (%)	97,3 (81,6)	97,4 (82,6)	99,8 (100,0)	100,0 (100,0)	100,0 (100,0)
Redundanz	7,7 (7,3)	27,3 (25,8)	13,1 (12,2)	14,2 (14,5)	7,4 (6,9)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	19,6 (7,3)	32,5 (12,8)	20,2 (9,5)	18,9 (4,9)	11,5 (5,0)
Wilson Factor [Å ²]	24,4	23,8	26,1	24,7	36,7

Die Werte in Klammern beziehen sich auf die letzte Auflösungsschale.

3.2.5 Strukturbeschreibung von CloQ, CloQ-C215S und CloQ-R66S

Die WT-4HPP-Struktur enthält 313 von 324 Aminosäuren der Wildtyp-Sequenz und drei zusätzliche N-terminale Aminosäuren (GSH), die durch die Klonierung in pET28a hinzugefügt wurden und nach der Thrombinspaltung zurückblieben. Die dreidimensionale Struktur entspricht dem Strukturprinzip des PT-*barrels* (Abb. 3.14), das bisher nur in zwei Proteinen gefunden wurde, dem bakteriellen NphB aus *Streptomyces* sp. CL190 (Kuzuyama *et al.*, 2005) und der DMATS (FgaPT2) aus dem Pilz *Aspergillus fumigatus* (Kap. 3.1). CloQ ist ca. 35 Å hoch und hat einen Durchmesser von 50 Å, was ungefähr der Größe von NphB entspricht. FgaPT2 ist nur hinsichtlich des β -*barrels* in der Größe vergleichbar, mehrere *loop*-Regionen sind deutlich länger als die von CloQ und NphB (Abb. 3.14).

Wie die anderen beiden Proteine besitzt CloQ fünf ähnliche, sich wiederholende $\alpha\beta$ -Einheiten (Abb. 3.14 B). Die zehn antiparallelen β -Stränge bilden ein *barrel*, das von α -Helices umgeben ist. Die Helices sind über hydrophobe Wechselwirkungen eng an die β -Stränge angelagert. Das Innere des β -*barrels* stellt einen großen Hohlraum dar, was in deutlichem Kontrast zum TIM-*barrel* steht. Das TIM-*barrel* enthält nur acht parallele β -Stränge. Die im PT-*barrel* zusätzlichen zwei β -Stränge führen am Proteinrückgrat zu einem vergrößerten Radius des *barrels*. In allen drei Proteinen (NphB, FgaPT2 und CloQ) ragen sowohl polare als auch unpolare Seitenketten in den Hohlraum. Die positiv geladenen Seitenketten häufen sich in der oberen Hälfte und die unpolaren Seitenketten in der unteren Hälfte des Hohlraums. In NphB und FgaPT2 wurde gezeigt, dass die Substrate in diesem Hohlraum gebunden werden und dort miteinander reagieren. (Abb. 3.15). Bei NphB und FgaPT2 bildet der Hohlraum einen Kanal, der Grund zu der Annahme gibt, er

könnte für die Substrate sowohl von oben als auch von unten zugänglich sein (Abb. 3.16), wobei an dieser Stelle angemerkt werden muss, dass bei FgaPT2 ca. 30 C-terminale Aminosäuren aufgrund ihrer Flexibilität in der Struktur nicht eindeutig dargestellt werden konnten. Bei CloQ dagegen ist das *barrel* nur von oben zugänglich, es wird nach unten hin enger und wird schließlich durch die C-terminalen Aminosäuren, hauptsächlich durch die der α -Helix 11, verschlossen.

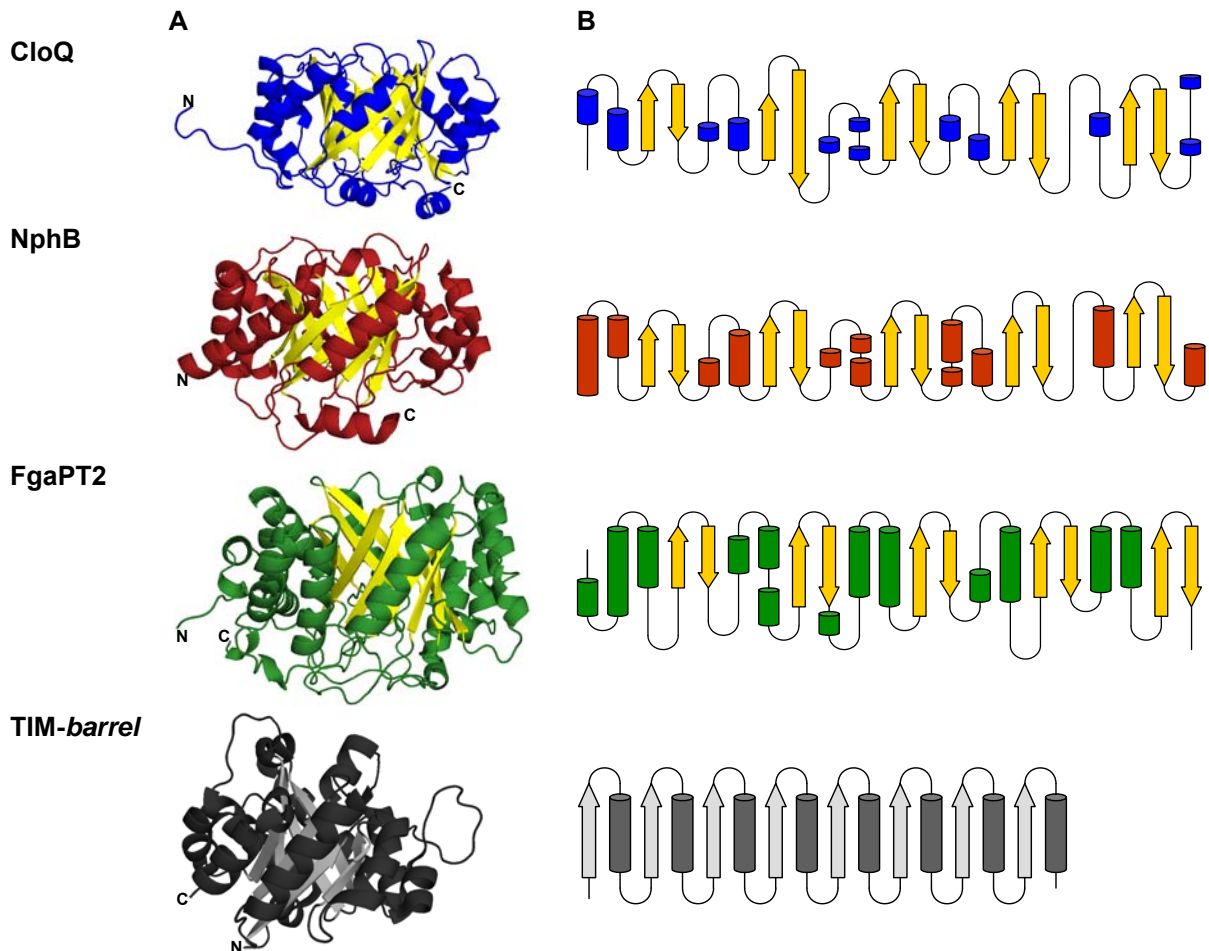


Abb. 3.14 PT-*barrel* und TIM-*barrel*. (A) Dreidimensionale Struktur von CloQ, NphB, FgaPT2 und Triosephosphatisomerase (1TIM – RCSB Proteindatenbank). (B) Schematische Darstellung der Sekundärstrukturelemente der PT-*barrels* von CloQ, NphB, FgaPT2 und des TIM-*barrels* der Triosephosphatisomerase. In den Darstellungen sind alle β -Stränge hell und die α -Helices und *loop*-Regionen dunkel gefärbt.

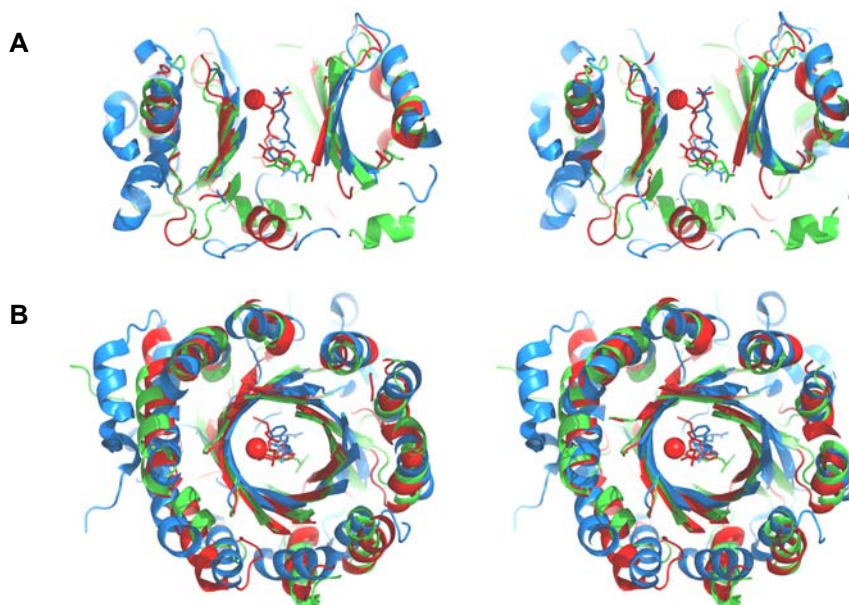


Abb. 3.15 Stereodarstellungen der übereinander gelegten dreidimensionalen Strukturen von CloQ (grün), NphB (rot) und FgaPT2 (blau) mit Substraten. (A) Schnitt durchs *barrel*, Seitenansicht. (B) Schnitt durchs *barrel*, Draufsicht. (Abb. von Dr. D. Lawson).

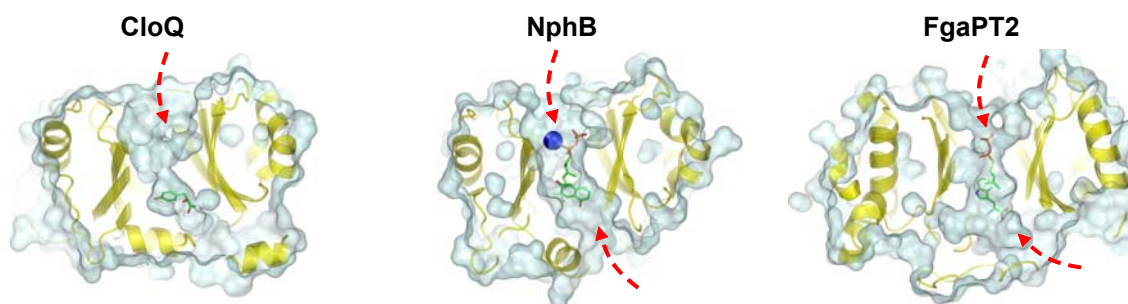


Abb. 3.16 Schnitt durch die molekularen Oberflächen der Strukturen von CloQ, NphB und FgaPT2 mit Blick in die aktiven Zentren. Die Pfeile deuten die möglichen Zugänge für die Substrate ins aktive Zentrum an. (Abb. von Dr. D. Lawson).

Die CloQ-Struktur ohne Substrate (Apo) ist, unter Berücksichtigung der Auflösung von 3,1 Å, der WT-4HPP-Struktur sehr ähnlich und zeigt insbesondere im aktiven Zentrum keine nennenswerten Veränderungen, abgesehen von einer deutlichen Verschiebung der Seitenkette von W122 (Abb. 3.17 C). Auch die Strukturen der mutierten Enzyme CloQ-C215S und CloQ-R66S sind der WT-4HPP-Struktur sehr ähnlich. Aus der Elektronendichte der CloQ-R66S-Struktur geht eindeutig hervor, dass auch hier 4-HPP gebunden ist (R66S-4HPP-Struktur) (Abb. 3.17 C). In der Struktur von CloQ-C215S (C215S-Struktur) ist dagegen an der Position, wo in der WT-4HPP-Struktur das 4-HPP lokalisiert ist, eine nicht zuordenbare Elektronendichte zu erkennen, weder 4-HPP noch ein anderer möglicher Ligand konnte dieser Dichte zugeordnet werden (Abb. 3.17 B). Bezüglich der Seitenketten zeigt Y233 in der C215S-Struktur eine andere Position als in der WT-4HPP-Struktur, und die Guanidingruppe von R66 ist leicht verdreht (Abb. 3.17 B). In der R66S-4HPP-

Struktur ist der aromatische Ring von F68 in Richtung der Seitenkette der Aminosäure an Position 66 verschoben. Da die zuvor vorhandene Arginin-Seitenkette durch die weniger sperrige Serin-Seitenkette ersetzt wurde (R66S), wird der freiwerdende Platz vom aromatischen Ring von F68 eingenommen. In allen vier Strukturen haben jedoch die meisten Seitenketten im aktiven Zentrum ähnliche Positionen (Abb. 3.17 C).

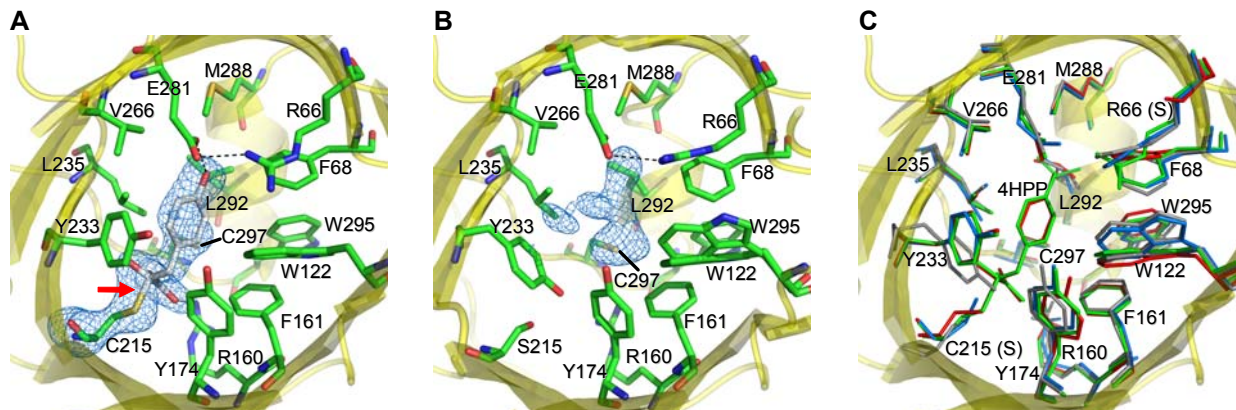


Abb. 3.17 Die aktiven Zentren der Strukturen WT-4HPP, Apo, C215S und R66S-4HPP. (A) WT-4HPP-Struktur mit der Elektronendichte für 4-HPP und C215S (blau); der rote Pfeil markiert die kovalente Bindung von 4-HPP mit C215. **(B)** C215S-Struktur (Kristall getränkt in 4-HPP-Lösung); die unzuordenbare Elektronendichte ist in blau gezeigt. **(C)** Überlagerung der WT-4HPP- (grün), Apo- (blau), C215S- (grau) und der R66S-Struktur (rot). (Abb. von Dr. D. Lawson).

3.2.6 Bindestelle von 4-HPP in CloQ

Wie die WT-4HPP-Struktur zeigt, ist die Bindestelle von 4-HPP im unteren Teil des *barrels* positioniert, was den Positionen der aromatischen Substrate in den Strukturen von NphB und DMATS entspricht (Abb. 3.15 A). Die Lage von 4-HPP der WT-4HPP-Struktur stimmt besonders gut mit der Lage von 1,6-DHN der NphB-Struktur überein. Die aromatischen Substrate der NphB- und FgaPT2-Struktur werden durch nicht-kovalente Interaktionen an ihrer Bindestelle gehalten. Dagegen zeigt die WT-4HPP-Struktur eindeutig eine kovalente Bindung zwischen 4-HPP und der Thiolgruppe von C215. Die Bildung des Thiohemiketals wird durch die kontinuierliche Elektronendichte zwischen dem Protein und dem Substrat bestätigt und außerdem durch die nicht-planare Koordination der Atome, die an den α -Kohlenstoff der 4-HPP-Seitenkette gebunden sind (Abb. 3.17 A). Innerhalb der CloQ/NphB-Gruppe (Kap.1.3) der aromatischen Prenyltransferasen, ist das Cystein an der Position 215 nur in NovQ konserviert. NovQ zeigt zu CloQ eine Sequenzidentität von 84 %. In NphB, mit einer Sequenzidentität zu CloQ von 22 %, sitzt an dieser Position ein Serin (S214) und in FgaPT2 ist die in der Struktur entsprechende Aminosäure ein Methionin (M328) (Abb. 3.18).

Da CloQ für die WT-4HPP-Struktur in Anwesenheit von 4-HPP (2 mM) gereinigt und kristallisiert wurde erschien die kovalente Bindung zwischen C215 und 4-HPP zunächst als Artefakt, der sich aus dem intensiven Kontakt zwischen Protein und

Substrat ergeben hat. Allerdings zeigten auch eine andere Struktur des Wildtyp-Proteins und die R66S-4HPP-Struktur, entsprechend zur WT-4HPP-Struktur, ein an C215 kovalent gebundenes 4-HPP, obwohl beide Enzyme ohne 4-HPP-Zugabe gereinigt und kristallisiert wurden und die Protein-Substrat-Komplexe durch Tränkeexperimente entstanden sind.

Zur Überprüfung der Bedeutung der kovalenten Bindung für die enzymatische Katalyse wurden zwei mutierte Proteine hergestellt: CloQ-C215S und CloQ-C215A. Beide Proteine zeigten im Vergleich zu CloQ eine um 36 und 13 % erhöhte Aktivität. Damit konnte klar bewiesen werden, dass die kovalente Bindung zwischen C215 und 4-HPP für die katalytische Aktivität nicht von Bedeutung ist. Also scheint die gezeigte Thiohemiketalbildung unter physiologischen Bedingungen (*in vitro* und *in vivo*) leicht reversibel zu sein und stellt damit keinen *dead-end*-Komplex dar, der einen weiteren Substratumsatz unmöglich machen würde.

Nach der Kristallisation von CloQ-C215S wurden ebenfalls Tränkeexperimente mit 4-HPP (5 mM) durchgeführt. Die Struktur zeigt eine deutliche aber nicht zuordenbare Elektronendichte im Bereich des erwarteten 4-HPP (Abb. 3.17 B). Eine sehr wahrscheinliche Erklärung für diese Elektronendichte ist eine zum Teil ungeordnete Struktur des 4-HPP-Moleküls. 4-HPP liegt in einem Gleichgewicht aus seiner Keto- und Enol-Form vor (Keto-Enol-Tautomerie), was bereits mehrfach beschrieben und untersucht wurde (Chi *et al.*, 2003; Doy, 1960; Schwarz, 1961). Unter physiologischen Bedingungen ist die Keto-Form vorherrschend, doch auch die Enol-Form ist durch die Konjugation der Enol-Doppelbindung mit dem aromatischen Ring energetisch relativ günstig. Der Wechsel zwischen Keto- und Enol-Form könnte für die nicht genau definierte Anordnung von 4-HPP in der CloQ-Struktur verantwortlich sein. Erst durch die Fixierung der Keto-Form über die Hemiketalbildung mit C215 kann ein geordneter Zustand erreicht werden.

In den WT-4HPP- und R66S-4HPP-Strukturen bildet 4-HPP eine Salzbrücke mit R160 und Wasserstoffbrücken mit zwei Wassermolekülen, die sich am Boden des zentralen Hohlraums befinden. Die phenolische Hydroxygruppe von 4-HPP bildet eine Wasserstoffbrücke zu E281 und der aromatische Ring selbst interagiert mit einigen hydrophoben Seitenketten über Van-der-Waals-Wechselwirkungen, die bedeutsamsten dabei sind: F68, W122, Y174, Y233 und L235. Zusammen mit F161, V266, L292 und W295 bilden diese Seitenketten einen hydrophoben Gürtel im zentralen Hohlraum (Abb. 3.17 A und Abb. 3.19).

Wie bereits erwähnt, zeigt die C215S-Struktur im Vergleich zur WT-4HPP-Struktur eine deutliche Veränderung der Position der Seitenkette von Y233. Dies könnte möglicherweise durch eine veränderte Position von 4-HPP CloQ-C215S hervorgerufen worden sein (Abb. 3.17). Da jedoch die tatsächliche Lage von 4-HPP in der C215S-Struktur nicht bestimmt werden konnte, kann diese Hypothese gegenwärtig nicht belegt werden.

Ergebnisse und Diskussion

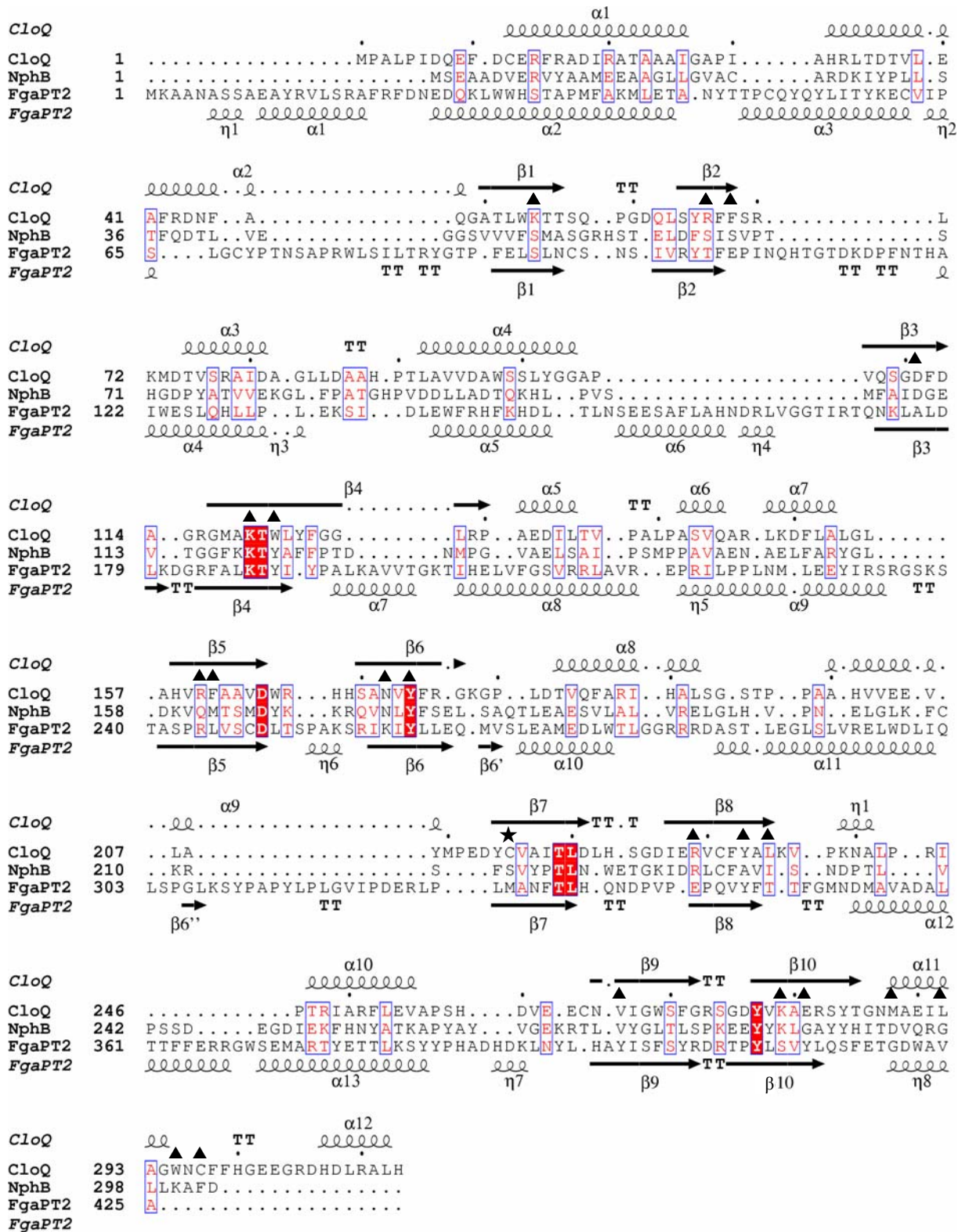


Abb. 3.18 Auf der Sekundärstruktur basierendes *alignment* der Aminosäuresequenzen von CloQ, NphB und FgaPT2. Das *alignment* wurde mit dem Programm SSM (Krissinel & Henrick, 2004) erstellt. Die Darstellung erfolgte mit ESPrpt 2.2 (Gouet *et al.*, 1999). α: α-Helices; η: 3₁₀-Helices; β: β-Stränge; TT: β-Schleifen; TTT: α-Schleifen; weiße Schrift auf rotem Hintergrund: Abschnitte mit Sequenzidentität; Rahmen: Abschnitte mit Sequenzähnlichkeit; ▲ = Aminosäuren im aktiven Zentrum (im Text erwähnt); ★ = C215.

3.2.7 Hypothetische Bindestelle für DMAPP

Die Strukturen von FgaPT2 (Kap.3.1) und von NphB (Kuzuyama *et al.*, 2005) wurden beide mit dem gebunden isoprenoiden Substrat bzw. dem nicht-hydrolysierbaren Substratanalogen (DMASPP bzw. GSPP) gezeigt. Für CloQ gelang dies, trotz vieler verschiedener Tränk- und Cokristallisationsexperimente nicht. Da aber die Bindestelle für das isoprenoide Substrat durch die Struktur von FgaPT2 und NphB sehr gut beschrieben ist und beide Proteine, insbesondere NphB, in Bezug auf die Struktur und auf einzelne Aminosäuren im aktiven Zentrum zu CloQ Ähnlichkeiten aufweisen, kann daraus die Bindestelle für DMAPP in CloQ abgeleitet und durch Mutagenese-Experimente bestätigt werden.

Wie oben beschrieben, ist 4-HPP in einem hydrophoben Gürtel im aktiven Zentrum von CloQ platziert. Oberhalb dieses Gürtels befindet sich eine polare Region, in der vor allem fünf positiv geladene Seitenketten in den Vordergrund treten: K54, R66, K120, R229 und K279. Solch eine polare Region kann auch in FgaPT2 und NphB beobachtet werden. In beiden Strukturen wird in diesem Bereich die Pyrophosphatgruppe des isoprenoiden Substrats durch Interaktion mit polaren Seitenketten festgehalten. Dabei wird die negative Ladung der Pyrophosphatgruppe durch die positiven Ladungen basischer Aminosäuren ausgeglichen. Im Mg^{2+} -unabhängigen Enzym FgaPT2 betrifft das die Aminosäuren R100, K187, R257, K259 und R404. In NphB ist ein Mg^{2+} -Ion an der Koordination der Pyrophosphatgruppe beteiligt, daher sind es nur drei positiv geladene Seitenketten, die neben Mg^{2+} beim Ausgleich der negativen Ladung eine Rolle spielen: K119, R228 und K284. Bemerkenswerterweise sind alle drei Aminosäuren in CloQ konserviert: K120, R229 und K279. Als Kuzuyama *et al.* (2005) die Struktur des Mg^{2+} -abhängigen Enzyms NphB vorstellten, wurde bereits spekuliert, dass im Mg^{2+} -unabhängigen CloQ die Funktion der positiven Ladung des Mg^{2+} -Ions durch die Seitenkette von K54 ersetzt werden könnte. Die vorliegenden CloQ-Strukturen zeigen tatsächlich K54 im polaren Bereich des aktiven Zentrums, wo die Bindestelle der Pyrophosphatgruppe vermutet wird. In NphB wurde außerdem eine Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenkette von N173 und der Pyrophosphatgruppe gefunden. Auch diese Seitenkette (N172) befindet sich in CloQ an der entsprechenden Position.

FgaPT2 zeigt zwar das gleiche Strukturprinzip wie CloQ und NphB, weist aber auf Aminosäureebene keine Ähnlichkeit, die statistisch über zufällige Ähnlichkeiten hinausgeht, zu den anderen beiden Enzymen auf. Dennoch befinden sich zwei der Aminosäuren, die mit der Pyrophosphatgruppe interagieren, in allen drei Enzymen an exakt der gleichen Position: K187 in FgaPT2 entspricht K120/K119 in CloQ/NphB und K259 entspricht N172/N173.

In NphB und FgaPT2 ist die hydrophobe Kohlenstoffkette des isoprenoiden Substrats von aromatischen Aminosäuren umgeben. Diese dienen nicht nur der Positionierung des Substrats sondern sind vor allem für den Reaktionsmechanismus von Bedeutung. Sie schirmen das allylische Kation von Nukleophilen ab, um eine Reaktion mit Wasser oder nukleophilen Aminosäuren zu verhindern. Zwei dieser

Aminosäuren sind in den Strukturen von FgaPT2, NphB und CloQ konserviert: Y261, Y175, Y174 und Y189, Y121, W122. Eine weitere Aminosäure, die in FgaPT2 an der Abschirmung des allylischen Kations beteiligt ist (Y345), ist in CloQ (Y233) konserviert, während sich in NphB zwar eine dritte aromatische Aminosäure in diesem Bereich befindet (Y216), deren Position aber leicht verschoben ist. In den aktiven Zentren von CloQ und FgaPT2 gibt es noch jeweils zwei weitere nicht-konservierte aromatische Seitenketten: F68 und F161 in CloQ und Y398 und Y413 in FgaPT2. In FgaPT2 sind diese beiden Seitenketten ebenfalls an der Abschirmung des reaktiven Carbokations beteiligt.

Aufgrund der aufgeführten hypothetischen Zuordnungen der Seitenketten des polaren Bereichs im aktiven Zentrum von CloQ zu einer bestimmten Funktion in der DMAPP-Bindung, wäre es nahe liegend, ein Modell des Proteins mit gebundenem DMAPP zu erstellen. Wie in Kap. 3.1.5 beschrieben, nehmen einige Aminosäuren des aktiven Zentrums von FgaPT2 unterschiedliche Positionen ein, abhängig davon ob die Substrate gebunden sind oder nicht (Abb. 3.6 D). Hierbei handelt es sich vorwiegend um Seitenketten, die an der Bindung der Pyrophosphatgruppe beteiligt sind, und es ist anzunehmen, dass solche räumlichen Veränderungen der Seitenketten auch in CloQ mit Bindung der Substrate auftreten und daher ein Modell, das auf einer der vorliegenden CloQ-Strukturen beruht, nicht plausibel wäre. Aus diesem Grund wurde eine schematische Abbildung erstellt, die die abgeleiteten Interaktionen der Seitenketten des aktiven Zentrums mit DMAPP darstellt (Abb. 3.19).

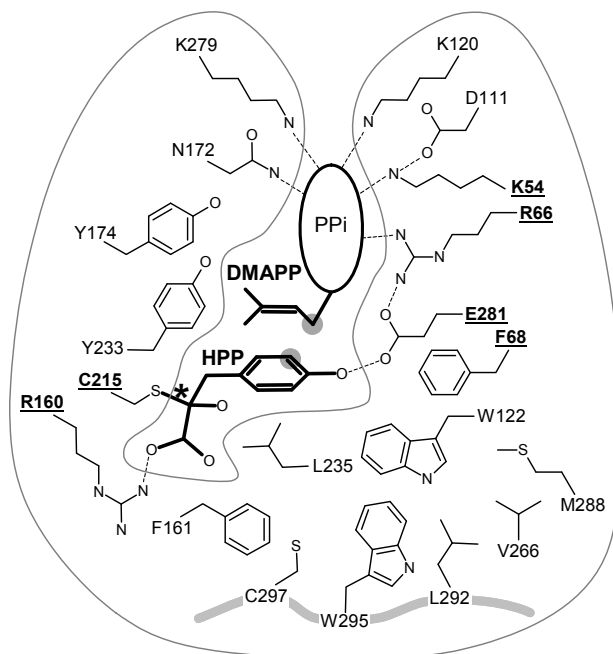


Abb. 3.19 Schematische Darstellung des aktiven Zentrums von CloQ mit dem kovalent gebundenen 4-HPP und der hypothetischen Bindestelle von DMAPP. Die C-Atome, die bei der Reaktion kovalent miteinander verknüpft werden, sind grau hinterlegt; H-Atome sind nicht dargestellt; gestrichelte Linien kennzeichnen Wasserstoffbrücken (bzgl. PPi hypothetisch, bzgl. 4-HPP gemäß Struktur); die kovalente Bindung zwischen 4-HPP und C215 ist mit einem Stern gekennzeichnet; unterstrichene Seitenkettenbezeichnungen kennzeichnen Aminosäuren, die für weitere Untersuchungen mutiert wurden.

3.2.8 Reaktionsmechanismus von CloQ

CloQ katalysiert eine regioselektive Alkylierung von 4-HPP, wobei DMAPP als Prenyldonor fungiert und 3-Dimethylallyl-4-HPP entsteht. Wie beim Reaktionsmechanismus der FPP-Synthase (Poulter, 2006) und der Terpenzyklasen (Degenhardt *et al.*, 2009), wird auch beim Reaktionsmechanismus der aromatischen Prenyltransferasen ein Carbokation gebildet (Gebler *et al.*, 1992; Kuzuyama *et al.*, 2005), siehe auch Kap. 3.1.5. Mit diesem Kation erfolgt der nukleophile Angriff auf den aromatischen Ring, was mechanistisch einer Friedel-Crafts-Alkylierung entspricht. Bei der Friedel-Crafts-Alkylierung wird die Aktivierungsenergie für die Carbokation-Bildung durch spezielle Katalysatoren wie z.B. AlCl_3 herabgesetzt. Beim enzymkatalysierten Prenyltransfer auf das aromatische Substrat, tragen zwei Effekte zum Herabsetzen der Aktivierungsenergie zur Bildung des Carbokations bei: Erstens ermöglicht die allylische Struktur des isoprenoiden Substrats die Bildung eines mesomeriestabilisierten Carbokations. Zweitens erleichtern starke Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Seitenketten, die auch im aktiven Zentrum von CloQ vorkommen, und den negativen Ladungen der Pyrophosphatgruppe das Spalten der C-O-Bindung des isoprenoiden Substrats. Außerdem kann die Aktivierungsenergie auch durch Kation- π -Interaktionen herabgesetzt werden, d.h. das allylische Kation interagiert mit den π -Elektronen des aromatischen Substrats und mit den π -Elektronen aromatischer Seitenketten (vgl. Kap. 3.1.5).

Wie bereits erwähnt, ist die hypothetische Bindestelle von DMAPP in CloQ von mehreren aromatischen Aminosäuren umgeben. Diese könnten wie bei FgaPT2 an den beschriebenen Kation- π -Interaktionen beteiligt sein.

Die Bindung des Dimethylallylkations an C-3 des aromatischen Rings von 4-HPP ergibt einen intermediären, positiv geladenen σ -Komplex. Die Reaktivität von 4-HPP würde für die elektrophile Substitution stark erhöht werden, wenn das Proton der phenolischen Hydroxygruppe von einer basischen Seitenkette abstrahiert würde, um die positive Ladung des intermediären σ -Komplexes herabzusetzen. Tatsächlich zeigt die WT-4HPP-Struktur eine Wasserstoffbrücke zwischen der phenolischen Hydroxygruppe und der Carboxygruppe von E281.

Im letzten Schritt der elektrophilen aromatischen Substitution wird das Proton von dem Kohlenstoff des σ -Komplexes abstrahiert, an den der Dimethylallylsubstituent angehängt wurde, d.h. im Falle von CloQ von C-3 des aromatischen Rings von 4-HPP. Wie bereits erwähnt, bildet die Carboxygruppe von E281 eine Wasserstoffbrücke zur phenolischen Hydroxygruppe von 4-HPP. Der zweite Sauerstoff dieser Carboxygruppe steht in idealer Lage, um das Proton von C3 zu abstrahieren. Diesen doppelten Einfluss der Seitenkette E281 auf den Reaktionsmechanismus muss gegenwärtig rein hypothetisch betrachtet werden, zumal die exakten Positionen beider Substrate nicht gesichert bestimmt werden konnten. Die grundsätzlich wichtige Bedeutung von E281 für die Katalyse konnte jedoch durch ortsgerichtete Mutagenese bestätigt werden (siehe nachfolgende Ausführungen zur Mutagenese von CloQ).

Die Abschirmung des reaktiven Carbokations von Nucleophilen, um eine Reaktion mit Wasser oder eine Alkylierung des Proteins zu vermeiden, ist die Voraussetzung für die enzymatische elektrophile Substitution. Dies ist der Grund für die tief im Kern des *barrels* liegende Position des aktiven Zentrums und für die besondere Bedeutung eines lösungsmittelfreien hydrophoben Gürtels innerhalb des *barrels*.

3.2.9 Biochemische Untersuchungen zu CloQ und den CloQ-Mutanten

Die experimentelle Bestimmung der CloQ-Struktur und der Vergleich mit den Strukturen von NphB und FgaPT2 ermöglichten die Aufstellung von Hypothesen, die die Funktion mehrerer Seitenketten bei der Substratbindung bzw. während der katalytischen Reaktion beschreiben. Um diese Hypothesen zu bekräftigen, wurden Mutagenese-Experimente durchgeführt.

Zunächst wurden die Seitenketten, die an der Bindung des aromatischen Substrats beteiligt sind untersucht, d.h. C215, E281 und R160. Wie zuvor beschrieben, zeigt die WT-4HPP-Struktur und die R66S-Struktur eine kovalente Bindung zwischen 4-HPP und C215. Doch sowohl die Mutation von C215 zu Serin als auch zu Alanin führten zu Enzymen, die die Aktivität vom nicht-mutierten CloQ erreichten bzw. übertrafen (Abb. 3.20). Daraus lässt sich schließen, dass die kovalente Bindung für die Katalyse nicht essentiell ist.

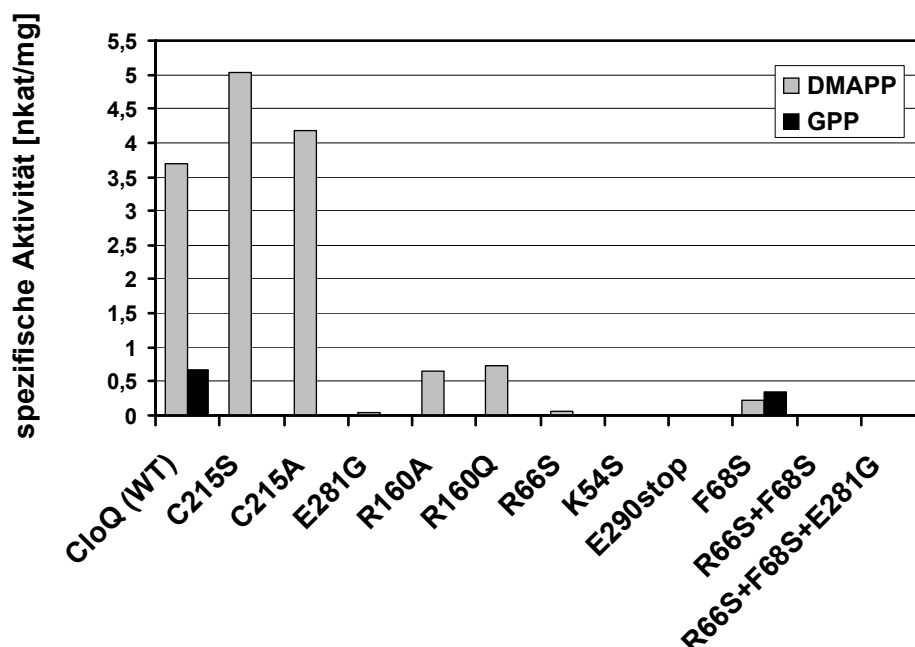


Abb. 3.20 Graphische Darstellung der spezifischen Aktivität [nkat/mg] von CloQ (Wildtyp-Protein) und von den hergestellten CloQ-Mutanten. Die Aktivitäten wurden mit den Substraten 4-HPP und DMAPP bestimmt. Für CloQ und CloQ-F68S, -R66S+F68S und -R66S+F68S+E281G wurden sie zusätzlich mit GPP bestimmt.

Die Strukturen mit gebundenem 4-HPP zeigen außerdem eine Wasserstoffbrücke zwischen der Seitenkette E281 und der phenolischen Hydroxygruppe von 4-HPP. Diese Wasserstoffbrücke dient nicht nur zur Positionierung des aromatischen Substrats sondern wie zuvor beschrieben, auch zu dessen Aktivierung für die elektrophile Substitution. Außerdem könnte E281 auch an der Abstraktion des Protons vom intermediären σ -Komplex beteiligt sein. Tatsächlich bestätigte die Mutation von E281 seine wesentliche Bedeutung für die Katalyse. Das Protein CloQ-E281G zeigte nahezu keine Aktivität.

Auch R160 bildet eine Wasserstoffbrücke zu 4-HPP, in diesem Fall zur Carboxygruppe. Die Proteine CloQ-R160Q und -R160A wiesen beide noch eine Restaktivität von ca. 20 % auf, was zeigt, dass R160 für die Katalyse nicht zwingend erforderlich ist.

Auch einzelne Aminosäuren, die wahrscheinlich an der Bindung der Pyrophosphatgruppe von DMAPP beteiligt sind wurden untersucht. Von den vorgeschlagenen basischen Seitenketten sind K120, R229 und K279 in NphB hoch konserviert und ihre Funktion konnte mit der NphB-Struktur eindeutig gezeigt werden. Im Gegensatz dazu ist die Aminosäure R66 von CloQ in NphB nicht konserviert. R66 befindet sich aber im polaren Bereich des aktiven Zentrums von CloQ, was die Beteiligung an der DMAPP-Bindung vermuten lässt. Tatsächlich wurde die Aktivität durch die Mutation R66S stark reduziert (um 98 %), was diese Vermutung bestätigt.

Von besonderer Bedeutung für das Mg^{2+} -unabhängige Enzym CloQ ist die Seitenkette K54. Von ihr wird angenommen, dass sie in CloQ die Funktion der positiven Ladung des Mg^{2+} -Ions in NphB, das dort an der Koordination der Pyrophosphatgruppe beteiligt ist, übernimmt (Kuzuyama *et al.*, 2005; Tello *et al.*, 2008). Entsprechend dieser Hypothese wurde Lysin zu Serin mutiert und das Enzym verlor wie erwartet seine Aktivität.

Ein grundsätzlicher Unterschied zwischen den Strukturen von CloQ, NphB und FgaPT2 (Abb. 3.16) besteht im unteren Teil des *barrels*, das bei CloQ durch das C-terminale Ende (insbesondere durch die α -Helix 11) des Proteins verschlossen zu sein scheint. Damit besteht bei CloQ für die Substrate nur die Möglichkeit, von oben ins aktive Zentrum zu gelangen. Da dieses C-terminale Ende nicht in die Substratbindung mit einbezogen ist, wurde durch Einführen eines Stop-Codons ein Protein ohne dieses C-terminale Ende hergestellt, um zu überprüfen, ob sich dadurch ein erleichterter Zugang der Substrate zum aktiven Zentrum ergibt. Doch das verkürzte Protein wies keine enzymatische Aktivität mehr auf.

Eine weitere Reihe von Mutationen bezog sich auf die Spezifität des Enzyms gegenüber dem isoprenoiden Substrat. Das genuine isoprenoide Substrat von NphB ist GPP (10 Kohlenstoffatome), während in CloQ DMAPP (5 Kohlenstoffatome) verwendet wird. Tello *et al.* (2008) schlussfolgerte nach *modelling*-Studien mit CloQ, dass die sperrige Seitenkette F68 in CloQ die Bindung von GPP aufgrund seiner Länge unmöglich macht. Die Mutation von F68 zu Serin führte jedoch zu keinem verbesserten Umsatz von GPP. Auch das Wildtyp-Protein setzt GPP in geringem

Maße um und CloQ-F68S zeigte nur noch 50 % der Enzymaktivität des Wildtyp-Proteins.

Tello *et al.* (2008) vermuteten außerdem, dass auch R66 und E281 die Bindung von GPP verhindern, da sie mit der möglichen GPP-Bindestelle kollidieren. Da diese beiden Seitenketten aber für die Bindung der Pyrophosphatgruppe bzw. von 4-HPP von Bedeutung sind, führen Doppelmutationen (R66S+F68S) oder auch dreifache Mutationen (R66S+F68S+E281G) zu inaktiven Enzymen.

Im Zusammenhang mit der Frage der Aktivität von CloQ gegenüber GPP im Vergleich zu DMAPP wurden die kinetischen Parameter von CloQ mit unterschiedlichen Substraten bestimmt. Die K_m -Werte der genuinen Substrate 4-HPP und DMAPP betragen 16 μM und 25 μM (Tab. 3.4 und Abb. 3.21). Daraus ergibt sich eine katalytische Effizienz (k_{cat}/K_m) für 4-HPP von $10000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, die 1000-mal höher ist als die katalytische Effizienz für die Prenylierung von 1,6-DHN durch NphB ($7,7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Kumano *et al.*, 2008) und 4,5-mal geringer ist als die der Prenylierung von L-Tryptophan durch FgaPT2 ($46250 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Unsöld & Li, 2005).

Wie bereits erwähnt, unterliegt 4-HPP einer Keto-Enol-Tautomerie, und es war unklar, welche der beiden Formen als Substrat für die Prenylierung benutzt wird. Dies sollte mit der *p*-Cumarsäure als Substratanalogon zur Enol-Form von 4-HPP und L-Tyrosin als Substratanalogon zur Keto-Form von 4-HPP überprüft werden. Die katalytische Effizienz beim Umsatz des jeweiligen Substrats liegt bei 16 und 12 $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Tab. 3.4 und Abb. 3.21). Damit konnte keine Präferenz für die Keto- oder Enol-Form festgelegt werden.

Des Weiteren wurde der K_m -Wert für den Umsatz von GPP mit einem Wert von 307 μM bestimmt. Die katalytische Effizienz für die C10-Prenylierung von 4-HPP beträgt $95 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Verglichen mit der C5-Prenylierung von 4-HPP durch DMAPP ist die katalytische Effizienz mit GPP 100-mal geringer (Abb. 3.21 und Tab. 3.4).

Bevor die kinetischen Parameter bestimmt wurden, wurde die Produktbildung mit den jeweiligen Substraten mittels HPLC analysiert, die Produkte Dimethylallyl-Tyrosin und Geranyl-4-HPP wurden zusätzlich mittels LC-MS analysiert.

Tab. 3.4 Kinetische Parameter (K_m -Werte, Wechselzahl und katalytische Effizienz) von CloQ für unterschiedliche Substrate. Bei der Untersuchung der aromatischen Substrate wurde DMAPP als isoprenoides Substrat verwendet und bei der Untersuchung der isoprenoiden Substrate 4-HPP.

Substrat	K_m [μM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_m [$\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$]
4-HPP	16 ± 3.9	159×10^{-3}	10000
L-Tyrosin	680 ± 129	8.3×10^{-3}	12
<i>p</i> -Cumarsäure	874 ± 227	13.8×10^{-3}	16
DMAPP	25 ± 4.0	253×10^{-3}	10000
GPP	307 ± 55	29.1×10^{-3}	95

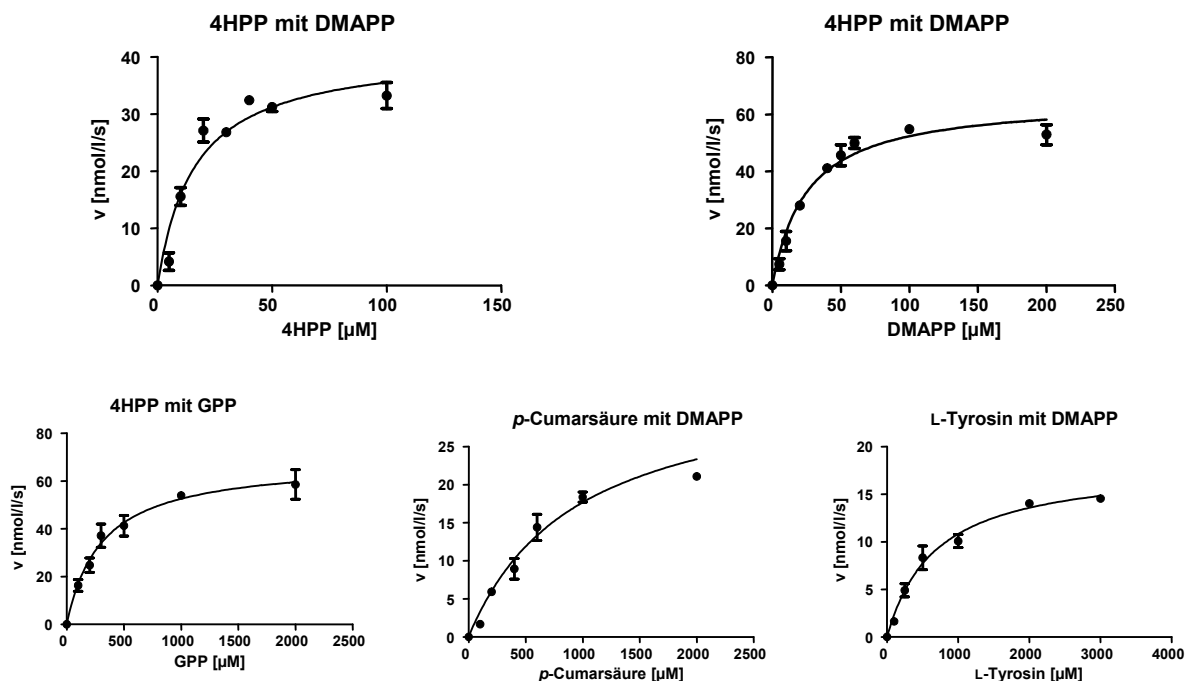


Abb. 3.21 Bestimmung der K_m -Werte für CloQ mit den Substraten 4-HPP, L-Tyrosin, p -Cumarsäure, DMAPP und GPP. Die Auswertung und Darstellung erfolgte mit der GraphPad Prism software V5.01.

Für NphB ist das natürliche aromatische Substrat nicht bekannt. Mehrere artifizielle aromatische Substrate wurden getestet und tatsächlich von NphB umgesetzt (Kumano *et al.*, 2008; Kuzuyama *et al.*, 2005). Aus diesen Daten folgerten die Autoren, dass das Enzym eine hohe Promiskuität für seine aromatischen Substrate aufweist. Dies wurde auch für NovQ diskutiert, denn es konnte gezeigt werden, dass durch dieses Enzym verschiedene Phenylpropanoide und Flavonoide prenyliert werden können (Ozaki *et al.*, 2009). Die grundsätzliche Möglichkeit, unterschiedliche Substrate umzusetzen, konnte nun auch in CloQ mit den Substraten L-Tyrosin, p -Cumarsäure und auch GPP gezeigt werden. Allerdings ist die katalytische Effizienz beim Umsatz eines nicht-genuinen Substrats verglichen mit dem Umsatz der genuinen Substrate 100- bis 1000-mal geringer. Unter physiologischen Bedingungen zeigen die aromatischen Prenyltransferasen also durchaus eine klare Präferenz für die genuinen Substrate. Die grundsätzliche Fähigkeit der aromatischen Prenyltransferasen, auch nicht-genuine Substrate umzusetzen, kann für die chemoenzymatische Synthese jedoch von Nutzen sein, da hierbei die artifiziellen Substrate in hohen Konzentrationen bereitgestellt werden können.

3.3 Kristallisation der Amidsynthetase NovL

Die Amidsynthetasen NovL, CloL, CouL und SimL aus den Biosynthesegenclustern von Aminocoumarinantibiotika katalysieren die Verknüpfung der Aminocoumarineinheit mit einer Säureeinheit. Dabei wird zunächst die Acylgruppe der Säureeinheit adenyliert bevor die Amidbindung mit der Aminogruppe der Aminocoumarineinheit geknüpft wird. Aufgrund der interessanten katalytischen Reaktion sollte die Struktur dieser Proteine aufgeklärt werden, um neue Erkenntnisse über die Substratbindung und den Reaktionsmechanismus zu gewinnen.

3.3.1 Klonierung von *novL*, *cloL*, *couL* und *simL*

Die Gene wurden mittels PCR aus dem jeweiligen *template* amplifiziert, in den Klonierungsvektor pGEM[®]-T eingebracht und schließlich in den Expressionsvektor pHis8 subkloniert. Die Richtigkeit der erhaltenen Konstrukte (pUM07 für *novL*, pUM09 für *cloL*, pUM05 für *couL* und pUM06 für *simL*) wurde durch Sequenzierung überprüft.

Die daraus resultierenden Proteine sind mit einem N-terminalen His₈-tag und einer Thrombinschnittstelle ausgestattet. Die ersten beiden N-terminalen Aminosäuren der Wildtyp-Sequenz wurden durch die Klonierung von vier bis sechs Aminosäuren ersetzt, wobei sich nach Thrombinspaltung für die Amidsynthetasen folgende N-terminale Aminosäureabfolgen ergeben: GSHGGSNK... (NovL), GSHENK... (CloL), GSHENR... (CouL), GSHGGN... (SimL).

3.3.2 Expression und Reinigung der Amidsynthetasen

Mit den oben genannten Expressionskonstrukten wurden NovL, CloL, CouL und SimL exprimiert und anschließend für die Kristallisation mit den in Tab. 3.5 aufgeführten Ausbeuten gereinigt. Die erfolgreiche Expression des Proteins durch Induktion (0,5 mM IPTG), die Löslichkeit des Proteins und die Abspaltung des His-tags konnten mittels SDS-PAGE gezeigt werden. Ein SDS-PAGE-Gel ist exemplarisch für NovL in Abb. 3.22 abgebildet. Die Endprodukte zeigen nur sehr geringe Spuren von Verunreinigungen (Abb. 3.23). Über Enzymassays mit anschließender HPLC-Analytik wurde die spezifische Aktivität der vier monomeren Amidsynthetasen bestimmt (Tab. 3.5). Hierfür wurden die Säuresubstrate 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure (für NovL, CloL und SimL) und 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure (für CouL) verwendet. Die Ergebnisse stimmen ungefähr mit den Literaturwerten überein: NovL 14,5 nkat/mg, CloL 4,2 nkat/mg (Galm *et al.*, 2004a), CouL 7,4 nkat/mg (Schmutz *et al.*, 2003), SimL 0,6 nkat/mg (Luft *et al.*, 2005).

Tab. 3.5 Ergebnisse zur Proteinreinigung und spezifische Aktivität der Amidsynthetasen.

Amid-synthetase	Ausbeute pro 1 L Kultur	Proteinkonzentration Endprodukt	$\epsilon_{\text{mit His-tag}}$ [L g ⁻¹ cm ⁻¹]	$\epsilon_{\text{ohne His-tag}}$ [L g ⁻¹ cm ⁻¹]	spezifische Aktivität
NovL	40 mg	19,5 mg/mL	0,75	0,77	13,0 nkat/mg
CloL	40 mg	15,4 mg/mL	0,74	0,77	3,4 nkat/mg
CouL	10 mg	22,7 mg/mL	0,82	0,85	1,3 nkat/mg
SimL	20 mg	19,5 mg/mL	0,91	0,94	1,0 nkat/mg

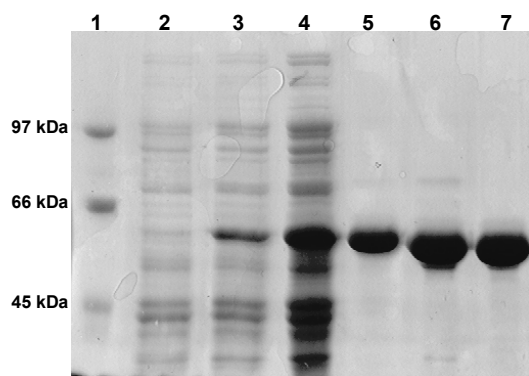


Abb. 3.22 SDS-PAGE zur Expression und Reinigung von NovL (57,2 kDa). Spur 1: Proteingrößenstandard; Spur 2: Gesamtprotein vor Induktion; Spur 3: Gesamtprotein nach Induktion; Spur 4: lösliches Protein nach Zellaufschluss; Spur 5: Eluat Affinitätschromatographie (10 µg NovL); Spur 6: nach Thrombinspaltung (15 µg NovL); Spur 7: gereinigtes Endprodukt (15 µg NovL).

Die Gewinnung von Phaseninformationen zur Aufklärung einer Struktur kann z.B. durch die direkte Inkorporation von Selen als Selenomethionin, das dann als anomaler Streuer dient, ins Zielprotein erreicht werden. Zur Herstellung eines Selenomethionin-Derivats wurde NovL in einem Milieu, in dem an Stelle von Methionin Selenomethionin in die Proteinkette eingebaut wird, mit dem Expressionskonstrukt pUM07 exprimiert und anschließend für die Kristallisation mit einer Ausbeute von 15 mg Protein pro 1 L Kultur gereinigt. Das Endprodukt ($c = 19 \text{ mg/mL}$) zeigte nahezu keine Verunreinigungen (Abb. 3.23). Über einen Enzymassay (mit Substrat 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure) mit anschließender HPLC-Analytik wurde die spezifische Aktivität des Enzyms nachgewiesen, sie beträgt 8,4 nkat/mg und ist damit nur geringfügig geringer als die des nativen Proteins.

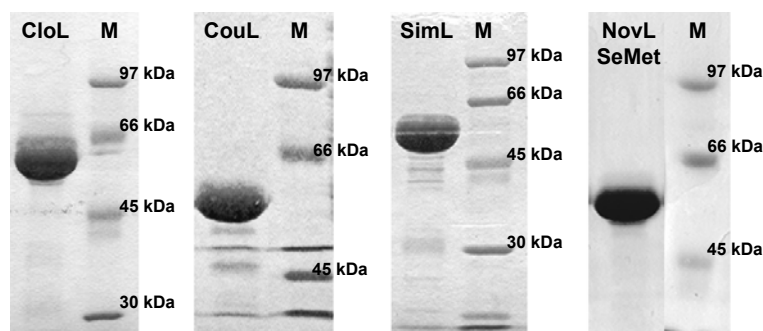


Abb. 3.23 SDS-PAGE zu den gereinigten Amidsynthetasen. Die erwartete molare Masse der Proteine beträgt 57,2 kDa (CloL, NovL-SeMet), 58,1 kDa (CouL), 55,3 kDa (SimL); M: Proteingrößenstandard; aufgetragen wurden jeweils 15 µg Protein.

3.3.3 Screening von Kristallisationsbedingungen

Beim initialen *screening* von 2712 verschiedenen Kristallisationsbedingungen bei 4 °C (in Gemeinschaftsarbeit mit Dr. Inge Unsöld) wurde für NovL eine Kristallisationsbedingung gefunden. CloL, CouL und SimL konnten nicht zur Kristallisation gebracht werden.

Die Kristalle von NovL erreichten nach ca. 2 Wochen ihre maximale Größe von durchschnittlich $100 \times 100 \times 50 \mu\text{m}$ (Abb. 3.24).

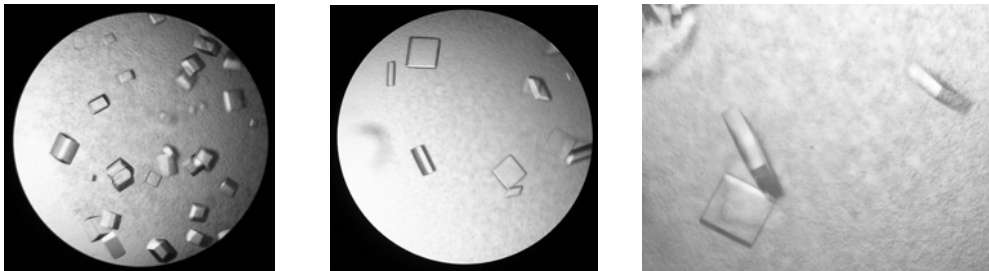


Abb. 3.24 NovL-Kristalle.

3.3.4 Optimierung des Kristallwachstums von NovL

Röntgenspektroskopische Messungen zeigten, dass ein Großteil der NovL-Kristalle verzwillingt und damit die Gewinnung von Daten zur Bestimmung der Proteinphasen erschwert ist. Von Johannes Romir konnten durch Tränkeexperimente Schwermetall-Derivate (Pt und Au) erzeugt werden, deren anomale Signale jedoch vom Signal des Zwillingsanteils der Kristalle überlagert wurden. Experimente mit dem erzeugten NovL-SeMet-Protein führten unter ähnlichen Kristallisationsbedingungen wie die von NovL, zu Kristallen von einer durchschnittlichen Größe von ca. $50 \times 50 \times 20 \mu\text{m}$. Jedoch wiesen auch diese Kristalle einen Zwillingsanteil von mindestens 20 % auf und konnten nicht zur Bestimmung der Proteinphasen herangezogen werden.

Eine Vielzahl von Experimenten (siehe Kap. 2.8.1) wurden zur Optimierung des Kristallwachstums durchgeführt. Außerdem wurde durch Cokristallisation mit Substraten und Substratanaloga (ATP, AMP-PNP, AMP-PCP, 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure und 3-Amino-4,7-dihydroxy-8-methylcoumarin, jeweils 5 mM) versucht, die Kristalleigenschaften zu verändern. Weitere *screens* für neue Kristallisationsbedingungen, die eine andere Kristallform hervorbringen, wurden durchgeführt. Hierzu wurden folgende *screens* bei 4 °C und 20 °C eingesetzt: Wizard I+II, Crystal Screen (HR2-110), Crystal Screen 2 (HR2-112) und ein laborinterner *screen* der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Stehle. Keine dieser Maßnahmen führte zu dem gewünschten Erfolg.

Daraufhin wurden Kristallisationsversuche mit veränderten NovL-Proteinen durchgeführt. NovL mit His-tag und methyliertes NovL wurden hergestellt und bei 4 °C für Kristallisationsexperimente (Wizard I + II und JCSG Core Suite I) eingesetzt.

NovL mit His-tag wurde mit einer Ausbeute von 40 mg/L Kultur und einer Endkonzentration von 18 mg/mL zu einem reinen Endprodukt gereinigt (Abb. 3.25). Bei der Herstellung des methylierten Proteins wurde eine Ausbeute von 19 % (bezogen auf die zur Methylierung eingesetzte NovL-Menge) des gereinigten Endproduktes (Abb. 3.25) mit einer Endkonzentration von 14 mg/mL erzielt. Von den Kristallisationsbedingungen führte eine zu kleinen Kristallen des methylierten Proteins. Diese werden derzeit zu einer messbaren Größe optimiert. Für alle NovL-Kristallmessungen wurde als Gefrierschutz Glycerin eingesetzt.

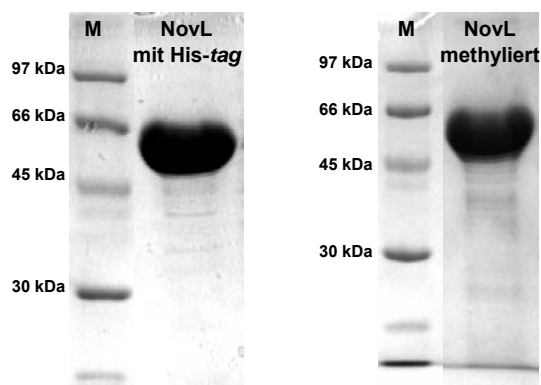


Abb. 3.25 SDS-PAGE des gereinigten NovL mit His-tag (59 kDa) und des methylierten NovL (57,5 kDa). M: Proteingrößenstandard; aufgetragen wurden jeweils 20 µg Protein.

Bislang konnte die Struktur von NovL nicht gelöst werden. Ein Datensatz eines nicht-verzwilligten Kristalls liegt mit einer Auflösung von 2,6 Å vor (Tab. 3.6). Die NovL-Kristalle gehören zur Raumgruppe $P4_12_12_1$ oder $P4_32_12$ und enthalten zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit. Für die Bestimmung der Proteinphasen werden derzeit Experimente mit mutierten NovL-Proteinen durchgeführt.

Tab. 3.6 Röntgenstrukturdaten von NovL.

	NovL
<i>beamline</i>	ESRF ID 14-2
Wellenlänge λ [Å]	0,933
Detektor	ADSC Quantum 4
Detektorabstand [mm]	235
Auflösung [Å]	2,6 (2,67 – 2,60)
Zellparameter [Å]	$a = b = 77,9 / c = 399,2$
Anzahl Reflexe gemessen	266243 (17148)
unabhängig	69748 (5065)
R_{meas} [%]	9,3 (78,4)
Vollständigkeit (%)	96,6 (95,5)
Multiplizität	3,8 (3,3)
$\langle I \rangle / \langle \sigma(I) \rangle$	12,21 (1,74)

3.4 Untersuchungen zur Substratspezifität der Amidsynthetasen NovL und CouL

Die Amidsynthetasen NovL und CouL aus den Biosynthesegenclustern der Aminocoumarinantibiotika Novobiocin und Coumermycin A₁ weisen eine Sequenzidentität von 81 % auf. Beide Enzyme katalysieren die Amidbindung zwischen einer Säureeinheit und der Aminocoumarineinheit unter vorheriger Adenylierung ihres Säuresubstrats (Abb. 3.26). Das Säuresubstrat von NovL ist 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure, das von CouL 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbon-säure. Es besitzt zwei Carboxygruppen und interessanterweise zeigt CouL die Fähigkeit, zunächst die Bildung des Monoamids und dann die Bildung des Diamids zu katalysieren. Die von Schmutz *et al.* (2003) vorgeschlagene Reaktionsfolge zeigt die Adenylierung des Säuresubstrats mit anschließendem Acyltransfer und danach die Adenylierung des entstandenen Monoamids mit dem zweiten Acyltransfer zur Bildung des Diamids. Dabei ist der Unterschied der Säuresubstrate, die beide durch das Enzym adenyliert werden, bezeichnend (Abb. 3.26). Frühere Studien zeigten, dass CouL ein breiteres Spektrum an Substraten umsetzt als NovL (Galm *et al.*, 2004a; Schmutz *et al.*, 2003).

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, Erkenntnisse über die Substratbindestellen der Amidsynthetasen zu gewinnen. Da die Struktur von NovL bisher nicht aufgeklärt werden konnte, sollte über die Konstruktion verschiedener Chimäre aus NovL und CouL die für die Substratbindung verantwortlichen Aminosäuresequenzabschnitte herausgearbeitet werden.

3.4.1 Herstellung der chimären Gene aus *novL* und *couL*

Als Grundlage zur Herstellung der chimären Gene diente das *alignment* der Aminosäuresequenzen von NovL und CouL (Abb. 3.27). Zwei Regionen, in denen sich die Aminosäuresequenzen besonders unterscheiden, fallen auf: die variable Region I und II und ganz besonders die variable Region IIa. Es wurde bereits spekuliert, dass Letztere bei der Bindung des Säuresubstrats eine wichtige Rolle spielen könnte (Schmutz *et al.*, 2003). Eine weitere Region, die an der Substratbindung beteiligt sein könnte ist der C-terminale Bereich, der ca. 100 Aminosäuren umfasst. Andere adenylatbildende Enzyme, die Adenylierungsdomänen der nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen, zeigen eine C-terminale Subdomäne von ca. 100 Aminosäuren, die während der Katalyse unterschiedliche Orientierungen einnimmt und damit offensichtlich die Substrate in der Bindetasche fixiert (Marahiel & Essen, 2009).

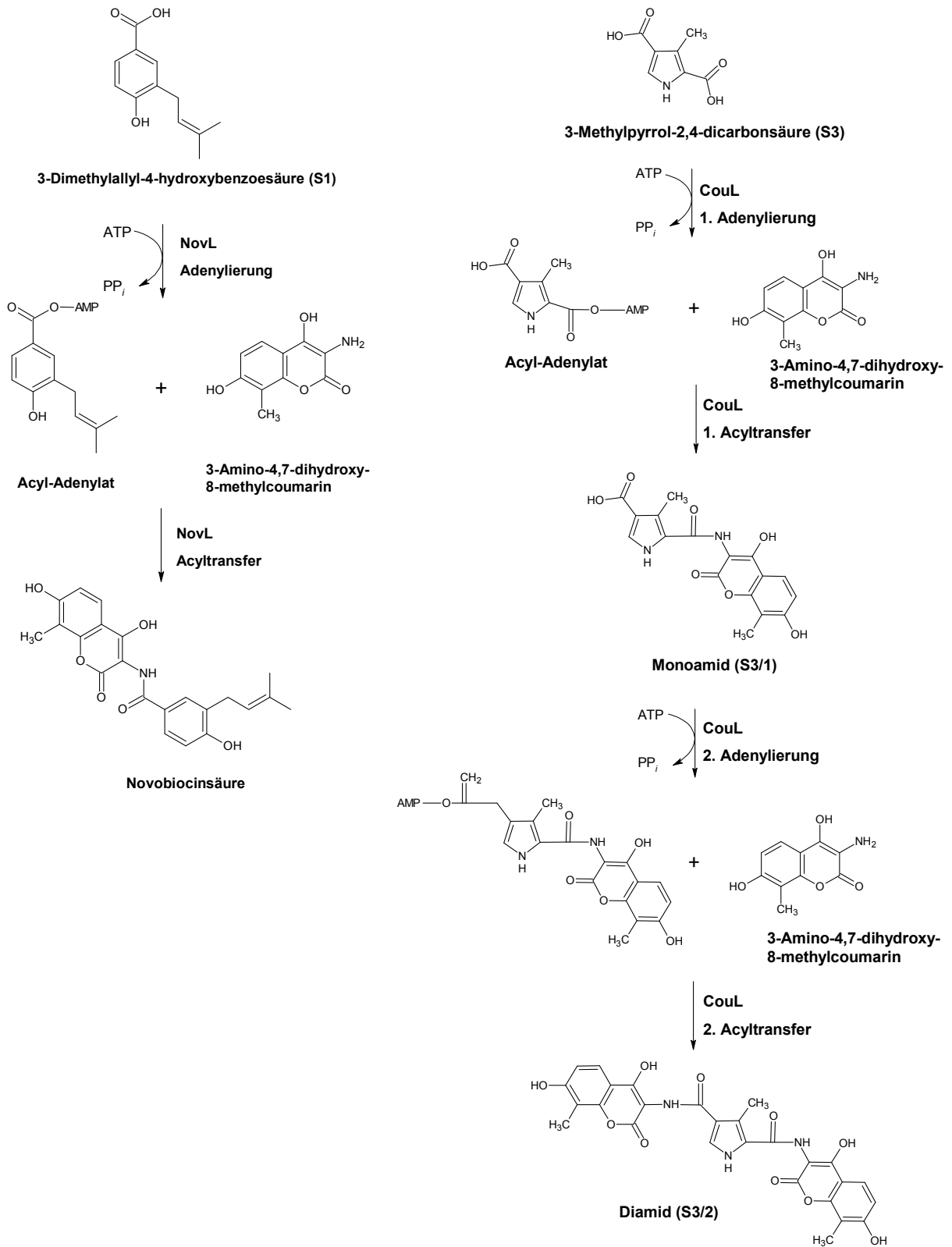


Abb. 3.26 Schematische Darstellung der von NovL und CouL katalysierten Reaktionen unter Bildung der Novobiocinsäure bzw. des Diamids der 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure (Schmutz *et al.*, 2003; Steffensky *et al.*, 2000a).

Somit wurden die variablen Regionen I und II (a und b) und die letzten 100 Aminosäuren des C-Terminus als Abschnitte für das Zusammensetzen der Chimäre gewählt. Die variable Region I umfasst die Aminosäuren von 161 bis 171 in NovL und CouL, die variable Region IIa die Aminosäuren von 192 bis 214 in NovL bzw. 192 bis 216 in CouL und die variable Region IIb die Aminosäuren von 215 bis 229 in NovL und von 217 bis 231 in CouL. Die C-terminale Region beginnt in NovL an Position 413 und in CouL an Position 415.

Das Zusammensetzen erfolgte durch eine Fusions-PCR, bei der sich die überlappenden Fragmente durch die DNA-Polymerase zu einem zusammenhängenden chimären Gen vereinigten. Dem folgte die Klonierung des chimären Gens in pGEM[®]-T und schließlich die Subklonierung über Restriktion und Ligation in den Expressionsvektor pHis8. Die korrekten Sequenzen der Konstrukte (Tab. 3.7) wurden alle durch Sequenzierung bestätigt.

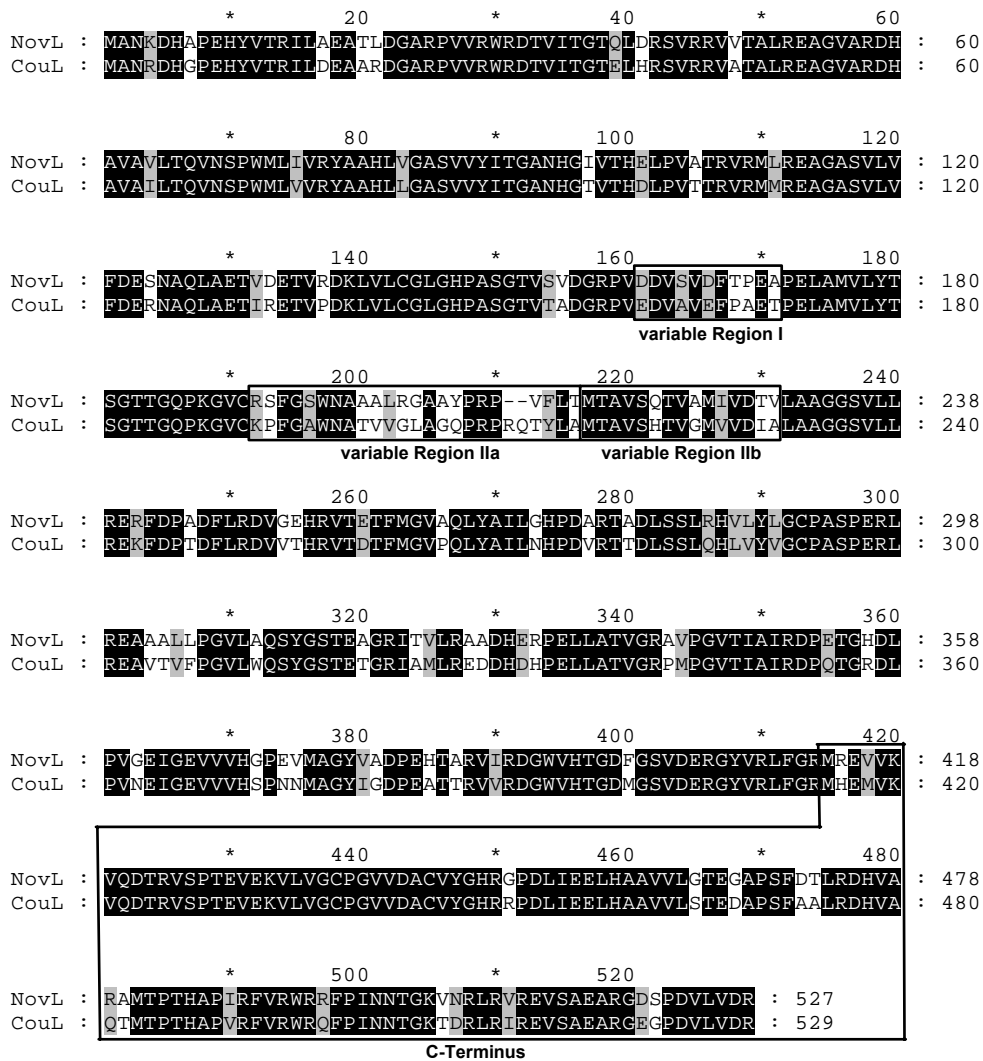
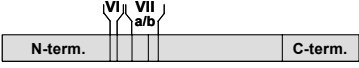

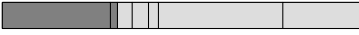











Abb. 3.27 Alignment der Aminosäuresequenzen von NovL und CouL. Das alignment wurde mit dem Programm GenDoc Version 2.6 erstellt. Weiße Buchstaben auf schwarzem Hintergrund kennzeichnen identische Aminosäuren, schwarze Buchstaben auf grauem Hintergrund kennzeichnen ähnliche Aminosäuren. Die Bereiche, die für die Herstellung der Chimären eine Rolle spielen, sind schwarz umrahmt und als variable Region I, II a, II b und C-Terminus bezeichnet.

3.4.2 Expression und Reinigung der NovL-CouL-Chimäre

Mit Hilfe der Expressionskonstrukte wurden zehn Chimäre exprimiert und gereinigt. Die jeweilige Ausbeute pro 1 L Kultur und die Endkonzentrationen sind in Tab. 3.7 aufgeführt. Die erhaltenen Endprodukte zeigen nur sehr geringe Spuren von Verunreinigungen (Abb. 3.28).

Tab. 3.7 Schematische Darstellung der hergestellten Chimäre und Ergebnisse zu deren Expression und Reinigung. Die CouL-Abschnitte sind hellgrau dargestellt, die NovL-Abschnitte dunkelgrau; VI = variable Region I; VII a+b = variable Region a und b; N-term. = N-Terminus; C-term. = C-Terminus.

Protein		Expressions-konstrukt	Ausbeute [mg] pro 1 L Kultur	Proteinkonz. Endprodukt [mg/mL]
CouL		pUM05	-	-
Chim1		pUM27	105	1,0
Chim 2		pSF06	127	4,1
Chim 3		pSF09	90	4,0
Chim 4		pUM24	82	5,6
Chim 5		pUM43	113	7,5
NovL		pUM07	-	-
Chim 8		pSF07	50	3,4
Chim 9		pSF04	94	5,2
Chim 10		pUM25	76	3,8
Chim 11		pSF05	68	3,8
Chim 12		pUM40	83	6,3

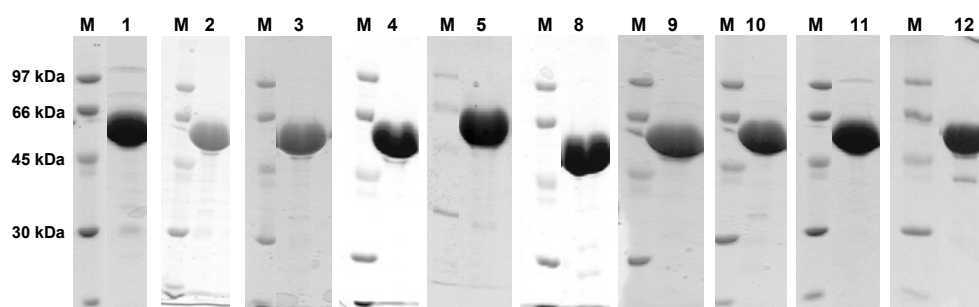


Abb. 3.28 SDS-PAGE der gereinigten Chimäre (57 kDa). M: Proteingrößenstandard; aufgetragen wurden jeweils 20 µg Protein. Die Zahlen kennzeichnen das jeweilige Chimär (1-5 und 8-12).

3.4.3 Aktivitätsbestimmungen für die NovL-CouL-Chimäre

Für die Erzeugung vergleichbarer Messdaten zur Enzymaktivität der Chimäre wurde zunächst die Enzymkonzentration ermittelt, die sowohl für NovL als auch für CouL bei jedem der eingesetzten Substrate hinsichtlich der Linearität und der Produktbildung im akzeptablen Bereich liegen sollte. Mit den Substraten 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoessäure, 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure und 3-Propyl-4-hydroxybenzoessäure (Abb. 3.26 und Abb. 3.29) wurden Enzymassays mit Proteinkonzentrationen von 0 bis 6 µg pro 100 µL Reaktionsansatz durchgeführt. Für 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoessäure ergab sich bei NovL ein linearer Anstieg bis 2 µg Protein pro 100 µL Reaktionsansatz, bei CouL bis > 6 µg. Mit dem genuine Substrat von CouL, 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure, zeigte sich eine Linearität für CouL bis > 6 µg pro 100 µL Reaktionsansatz, NovL zeigte keine Produktbildung. Für 3-Propyl-4-hydroxybenzoessäure war mit NovL ein linearer Verlauf bis 3,5 µg Enzym pro 100 µL Reaktionsansatz gegeben und für CouL bis > 6 µg (Abb. 3.30). Anhand dieser Ergebnisse wurde die Proteinmenge von 4 µg Enzym pro 100 µL Reaktionsansatz zur Untersuchung der Chimäre festgelegt. Da mit 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure als Substrat mit NovL kein Produkt und mit CouL nur sehr geringe Produktmengen gemessen werden konnten, wurden für dieses Substrat zusätzliche Messungen mit je 40 µg Protein durchgeführt.

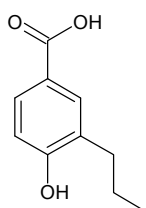


Abb. 3.29 Struktur von 3-Propyl-4-hydroxybenzoessäure (S2).

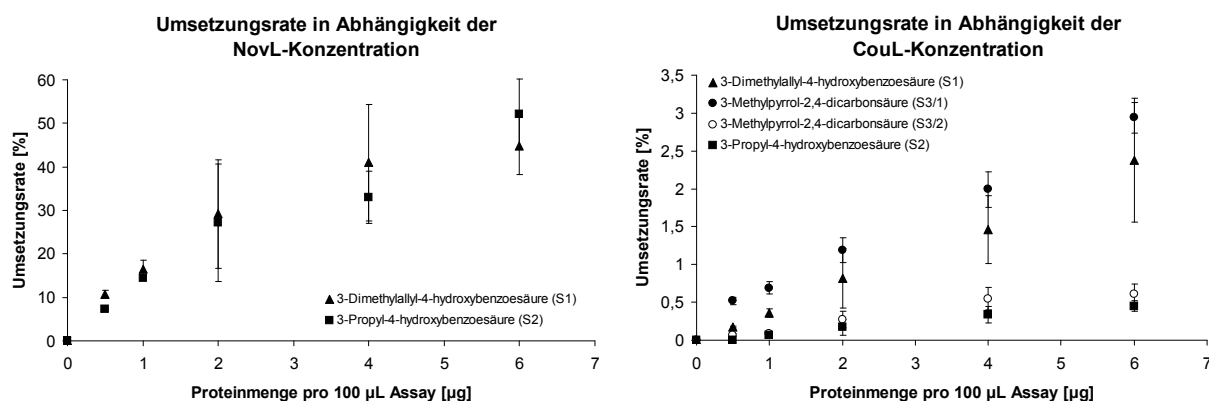


Abb. 3.30 Umsetzungsrate von 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoessäure (S1), 3-Propyl-4-hydroxybenzoessäure (S2) und 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure (S3/1 und 2) in Abhängigkeit der NovL- bzw. CouL-Konzentration.

Mit jedem Chimär wurden in einer Doppelbestimmung Enzymassays mit den Substraten 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoessäure, 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure und 3-Propyl-4-hydroxybenzoessäure durchgeführt. Die gebildeten Produkte wurden mittels HPLC nachgewiesen und quantifiziert und schließlich daraus die Aktivität berechnet (Abb. 3.31).

A

Protein	Relative Aktivität [%]					
	S1	S2	S3/1	S3/2	S3/1	S3/2
CouL	3,3	0,7	100	100	100	100
Chim1	5,8	1,0	187	85	135	80
Chim 2	3,5	0,4	114	29	111	67
Chim 3	11	1,5	41	< NG	55	35
Chim 4	7,6	1,0	15	< NG	33	35
Chim 5	106	89	< NG	< NG	3,5	< NG
NovL	100	100	< NG	< NG	3,9	< NG
Chim 8	119	119	< NG	< NG	6,1	< NG
Chim 9	109	97	< NG	< NG	5,3	< NG
Chim 10	82	48	< NG	< NG	6,2	< NG
Chim 11	24	23	< NG	< NG	8,4	< NG
Chim 12	4,6	0,9	85	82	106	89
	4 µg Protein				40 µg Protein	

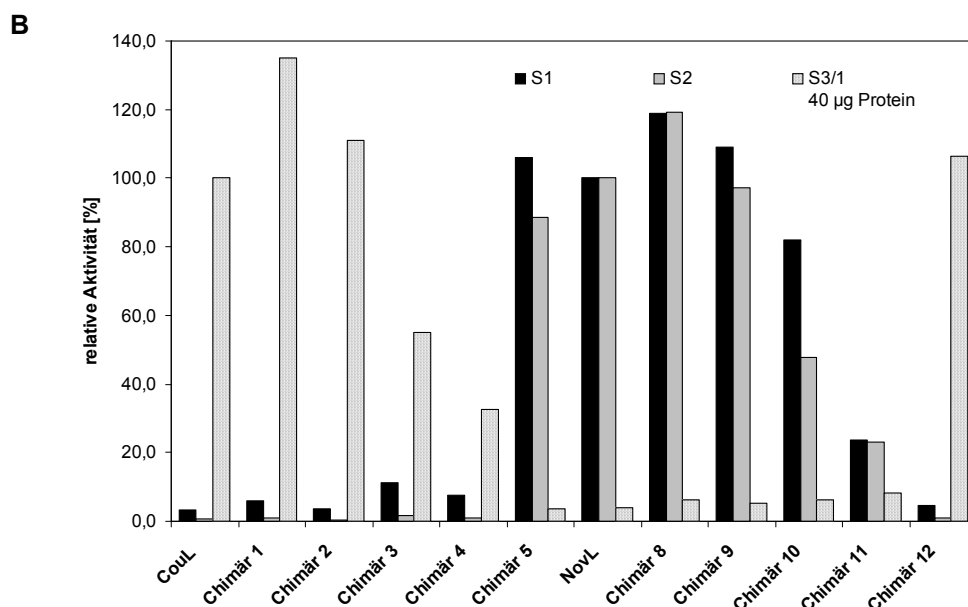


Abb. 3.31 Relative Aktivitäten von NovL, CouL und der Chimäre für die Säuresubstrate 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoessäure (S1), 3-Propyl-4-hydroxybenzoessäure (S2) und 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure (S3). (A) Tabellarische Darstellung; die relativen Aktivitäten wurden bezogen auf die Aktivitäten von NovL bzw. CouL; die jeweilige Bezugsgröße ist fett gedruckt. (B) Graphische Darstellung; S3/1 steht für die Produktbildung 1 (zum Monoamid) mit dem Substrat 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure, S3/2 steht entsprechend für die Produktbildung 2 (zum Diamid); < NG = unterhalb der Nachweisgrenze.

Nachfolgend werden die Ergebnisse zur Aktivität der hergestellten Chimäre für jedes Säuresubstrat vorgestellt und diskutiert.

3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure

Der Vergleich der Aktivitäten der Chimäre mit der Aktivität von NovL, dessen natürliches Säuresubstrat 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure ist, führt zu folgender Schlussfolgerung: Die variablen Regionen IIa und b, aber auch der Bereich zwischen der variablen Region IIb und dem C-Terminus enthalten Aminosäuren, die beim Umsatz eines entsprechenden Substrates eine Rolle spielen, wohingegen der N-Terminus, die variable Region I und der C-Terminus ohne Einfluss auf die Aktivität der Enzyme sind. Dies zeigen die relativen Aktivitäten der Chimäre 1, 2 und 12 bezüglich der Reaktion mit dem Säuresubstrat 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure. Sie liegen wie die von CouL im Bereich von 3,3 bis 5,8 %. Die relativen Aktivitäten der Chimäre 3 und 4 liegen geringfügig höher im Bereich von 7,6 bis 11 % und die der Chimäre 5, 8 und 9 wie NovL im Bereich von 100 %. Die Chimäre 10 und 11 wiesen einen Aktivitätsverlust auf, Chimär 10 zeigt noch 82 % und Chimär 11 nur noch 24 % bezogen auf die Aktivität von NovL. Das heißt, ausgehend von CouL führt der Ersatz der Sequenzbereiche N-Terminus und variable Region I durch die entsprechende Sequenz von NovL zu keiner veränderten Aktivität. Wird jedoch zusätzlich die variable Region IIa und IIb ersetzt, so kann eine schwache Aktivitätszunahme beobachtet werden. Der vollständige Ersatz der Sequenz von N-Terminus bis zum Beginn des C-terminalen Bereichs führt zu einem Enzym (Chimär 5) mit gleicher Aktivität wie NovL.

Ausgehend von NovL bleibt der Ersatz der Sequenzbereiche N-Terminus und variable Region I durch die entsprechende Sequenz von CouL ohne Einfluss auf die Aktivität. Erst beim Ersatz der variablen Region IIa ist eine leichte Abnahme der Aktivität zu verzeichnen. Wird zusätzlich die variable Region IIb ersetzt, kann eine Abnahme der relativen Aktivität um 76 % beobachtet werden. Besteht das Enzym nur noch im C-Terminus aus NovL, so zeigt es die gleiche Aktivität wie CouL.

3-Propyl-4-hydroxybenzoesäure

Mit dem Säuresubstrat 3-Propyl-4-hydroxybenzoesäure, das von NovL gleichermaßen akzeptiert wird wie das genuine Substrat 3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoesäure und von CouL nur geringfügig umgesetzt wird, findet sich ein vergleichbares Ergebnis. Die Chimäre 1 bis 4 und 12 zeigen alle wie CouL relative Aktivitäten im Bereich von 0,4 bis 1,5 %. In diesem Fall kann kein unterschiedliches Verhalten durch den Ersatz bestimmter Regionen beobachtet werden. Allerdings liegen die Umsatzraten all dieser Chimäre unter 1 %. Die Chimäre 5, 8 und 9 verhalten sich mit einer relativen Aktivität von ca. 100 % wie NovL. Bei Chimär 10 kann eine Abnahme der Aktivität um 52 %, bei Chimär 11 um 77 % beobachtet werden, was die oben beschriebene Schlussfolgerung bestätigt.

3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure

Da die 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure das natürlich Säuresubstrat von CouL ist, wurden die Aktivitäten der einzelnen Chimäre daher auf die Aktivität von CouL bezogen. Aufgrund der geringen Umsatzraten wurden für die Auswertung ausschließlich die Ergebnisse zur Bildung von Produkt 1 (Monoamid) der Messungen mit 40 µg Protein herangezogen. Die relativen Aktivitäten der Chimäre 1, 2 und 12 liegen wie die von CouL bei 100 %. Chimär 3 zeigt einen Aktivitätsverlust um 45 % und Chimär 4 von 67 %. Die Chimäre 5 und 8 – 11 zeigen eine ähnlich geringe Aktivität wie NovL (3,5 – 8,4 %).

So kann auch bei dieser Messreihe die oben beschriebene Schlussfolgerung gezogen werden. Erst der Ersatz des Sequenzbereiches vom N-Terminus bis einschließlich der variablen Region IIa führt zu einer veränderten Aktivität und zwar zu einem Aktivitätsverlust von 45 %. Durch zusätzlichen Ersatz der variablen Region IIb nimmt die Aktivität um 67 % ab. Besteht das Enzym nur noch im C-Terminus aus CouL zeigt es eine Aktivität wie NovL. Damit lässt sich auch hier zusammenfassen, dass die variablen Regionen IIa und b, aber auch der Bereich zwischen der variablen Region IIb und dem C-Terminus scheinbar eine Rolle bei der Substraterkennung spielen.

Die Erkenntnisse aus den Messungen zur Enzymaktivität der Chimäre bestätigen einerseits die Annahme, dass die variable Region IIa bei der Substraterkennung eine Rolle spielt, andererseits zeigen sie jedoch, dass der gesamten variablen Region II nicht die erwartete Bedeutung zuzuordnen ist. Es müssen mindestens ein weiterer substratbindender Bereich oder einzelne entscheidende Aminosäuren im nachfolgenden Sequenzabschnitt liegen.

3.4.4 Vergleich von NovL und CouL mit anderen adenylatbildenden Enzymen

NovL und CouL zeigen Homologie zur Familie der adenylatbildenden Enzyme. Wie bei den adenylatbildenden Enzymen wird auch durch NovL und CouL ein Säureadenylat aus dem Säuresubstrat und ATP gebildet (Schmutz *et al.*, 2003; Steffensky *et al.*, 2000a). In den letzten Jahren wurden mehrere dreidimensionale Strukturen von adenylatbildenden Enzymen veröffentlicht, z.B. von PheA, einer Untereinheit der Gramacidinsynthetase (Conti *et al.*, 1997) und von DhbE, eine Adenylierungsdomäne der NRPS aus der Bacillibactin-Biosynthese (May *et al.*, 2002). Der Sequenzvergleich von NovL mit PheA und DhbE zeigt eine Sequenzidentität von 23 % bzw. 27 %. Anhand der Sekundärstrukturvorhersagen von NovL und CouL, ausgeführt mit dem PSIPRED Protein Structure Prediction Server (McGuffin *et al.*, 2000), wurde ein *alignment* basierend auf der Sekundärstruktur (Krissinel & Henrick, 2004) mit PheA und DhbE erstellt, das wie erwartet die Ähnlichkeit der Sekundärstrukturen dieser zwei Enzymgruppen zeigt

(Abb. 3.32). Daneben zeigen NovL und CouL, trotz der geringen Sequenzähnlichkeit zu PheA und DhbE, konservierte Bereiche, die typischen Sequenzmotiven von adenylylatbildenden Enzymen zuzuordnen sind. Die Motive A1 bis A10 von PheA sind in Abb. 3.32 gekennzeichnet (Stachelhaus *et al.*, 1999). Neun von insgesamt elf Aminosäuren, die in PheA die AMP-Bindestelle bilden, sind in NovL/CouL konserviert: T180/180 (PheA: T190), Y313/315 (Y323), T316/318 (T326), E317/319 (E327), V338/340 (I348), Y377/379 (Y386), D397/399 (D413), R412/414 (R428) und K503/505 (K517). So könnten die genannten Aminosäuren oder zumindest ein Teil dieser Aminosäuren auch bei NovL und CouL an der AMP-Bindung beteiligt sein. Bei einem früheren Sequenzvergleich von NovL mit mehreren Acyl-CoA-Ligasen wurden ebenfalls konservierte Bereiche, die von den genannten Aminosäuren R412 und K503 enthalten, gefunden und deshalb ihre Beteiligung an der Adenylylatbildung vermutet (Steffensky *et al.*, 2000a).

Die AMP-Bindestelle in DhbE ist der von PheA sehr ähnlich. Ein Großteil der Aminosäuren ist konserviert. DhbE unterscheidet sich jedoch von PheA hinsichtlich des Säuresubstrat-Typs: In PheA wird eine Aminosäure aktiviert und in DhbE eine Arylsäure. Dieser Unterschied äußert sich in den Motiven A4 und A5. H234 von DhbE im Motiv A4, das keine Homologie zu Aminosäure-aktivierenden Enzymen wie PheA zeigt, bildet eine Wasserstoffbrücke zur Carboxygruppe des Säuresubstrats und ist in Arylsäure-aktivierenden Enzymen hoch konserviert. Eine weitere Aminosäure, die nur in Arylsäure-aktivierenden Enzymen hoch konserviert ist, befindet sich im Motiv A5 von DhbE: Q328 (May *et al.*, 2002). Auch NovL und CouL aktivieren eine Arylsäure und tatsächlich finden sich in diesen Enzymen zu Q328 von DhbE die korrespondierenden Aminosäuren Q311 (NovL) und Q313 (CouL). Das erwähnte Histidin (H234) ist nur in CouL konserviert (H222), in NovL befindet sich an dieser Stelle Q220 (Abb. 3.32). Dieser Unterschied, der in der variablen Region IIb lokalisiert ist, könnte ein entscheidender Punkt für die unterschiedliche Substratspezifität von NovL und CouL sein.

Ergebnisse und Diskussion

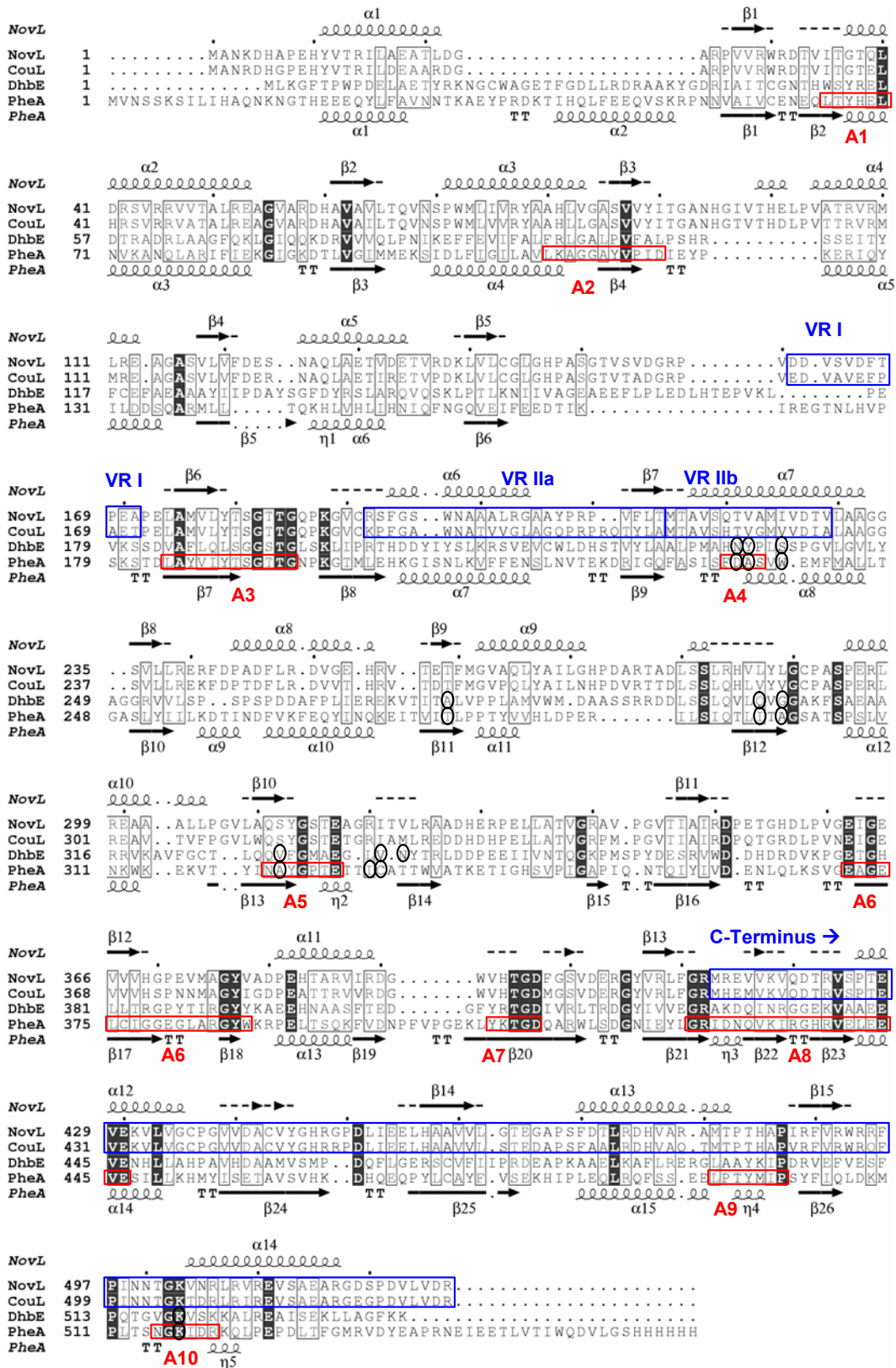


Abb. 3.32 Auf der Sekundärstruktur basierendes *alignment* der Aminosäuresequenzen von NovL, CouL, DhbE und PheA. Das *alignment* wurde mit dem Programm SSM (Krissinel & Henrick, 2004) erstellt. Die Darstellung erfolgte mit ESPrict 2.2 (Gouet *et al.*, 1999). α: α-Helices; η: 3₁₀-Helices; β: β-Stränge; TT: β-Schleifen; weiße Schrift auf rotem Hintergrund: Abschnitte mit Sequenzidentität; Rahmen: Abschnitte mit Sequenzähnlichkeit; Rahmen in PheA-Sequenz: typische Motive für adenylyl-bildende Enzyme A1-A10; Rahmen in NovL- und CouL-Sequenz: variable Region (VR) I, IIa, IIb, C-Terminus; eingekreiste Aminosäuren: für die Substraterkennung entscheidend (May *et al.*, 2002).

Die hochkonservierte Seitenkette K519 von Dh**bE** bildet nicht nur Wasserstoffbrücken zu AMP sondern auch zur Carboxygruppe des Arylsäure-Substrats. Auch diese Aminosäure ist in NovL und CouL konserviert (K503 und 505). K519 von Dh**bE** bzw. K517 von PheA ist Teil eines „Aminosäurenschlüssels“, der die allgemein gültige strukturelle Grundlage der Substraterkennung in adenylatbildenden Domänen der NRPS bildet (Stachelhaus *et al.*, 1999). Diesem „Schlüssel“ wurden die entsprechenden Aminosäuren von NovL und CouL zugeordnet (Abb. 3.33).

Pos. NovL	221	222	225	260	287	289	312	320	321	322	323	503
NovL	T	V	I	T	L	L	S	R	I	T	V	K
CouL	T	V	V	T	V	V	S	R	I	A	M	K
DhbE	N	Y	S	A	Q	G	V	V	N	K		
PheA	D	A	W	T	I	A	A	I	C	K		
Pos PheA	235	236	239	278	299	301	322	330	331	517		

Abb. 3.33 Aminosäuren, die in PheA und DhbE** für die Substraterkennung entscheidend sind.** Entsprechend dem *alignment* von Abb. 3.32 wurden die korrespondierenden Aminosäuren von NovL und CouL zugeordnet.

In NovL und CouL unterscheiden sich die Aminosäuren an den Positionen 225, 287, 289, 322 und 323 (Positionen beziehen sich auf NovL). Sofern dieser „Aminosäurenschlüssel“ konsequent von Dh**bE** und PheA auf NovL und CouL übertragen werden kann, könnte der Grund für die unterschiedliche Substratspezifität im Längenunterschied der Seitenketten Valin und Leucin bzw. Isoleucin und/oder im Unterschied zwischen den Seitenketten Threonin/Alanin und Valin/Methionin liegen. Dass eine Zuordnung der Aminosäuren auf Primärsequenzebene bei Proteinen, die nicht eng miteinander verwandt sind, nicht immer konsequent durchgeführt werden kann, zeigt der Vergleich der dreidimensionalen Strukturen von Dh**bE** und PheA (May *et al.*, 2002). Dadurch ergaben sich leichte Verschiebungen im Sequenz*alignment*, womit zwei Aminosäuren des „Aminosäurenschlüssels“ von PheA und Dh**bE** nicht mehr exakt übereinander stehen (Abb. 3.32). Demzufolge konnten für NovL und CouL die entsprechenden Aminosäuren nicht eindeutig angegeben werden, sondern nur ein Bereich von vier Aminosäuren (Abb. 3.33).

Zur Bestätigung der aufgeführten Hypothesen müssen die genannten NovL-Aminosäuren Q220, I225, L287, L289, T322 und 323 bezüglich ihres Einflusses auf die Substraterkennung untersucht werden.

Der beschriebene Sequenzvergleich bestätigt die gefundenen Ergebnisse zur Aktivität der Chimäre. Der N- und C-Terminus und die variable Region I sind nicht an der Substraterkennung beteiligt. Die Aminosäuren, die bei der Substraterkennung eine Rolle spielen, sind in der variablen Region IIb und im nachfolgenden Bereich bis hin zur C-terminalen Region positioniert.

4 Zusammenfassung

Die Dimethylallyltryptophansynthase (DMATS) katalysiert den ersten Schritt der Ergotalkaloid-Biosynthese und prenyliert dabei L-Tryptophan am C-4 des Indolrings mit Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) als Prenyldonor. Eine Vielzahl von Orthologen der DMATS wurde in Genomen von verschiedenen Pilzen nachgewiesen, aber von keinem der von diesen Genen codierten Enzyme konnte in der Vergangenheit die dreidimensionale Struktur ermittelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun zum ersten Mal die Röntgenstruktur einer DMATS aufgeklärt werden. Die Struktur von FgaPT2, der DMATS aus *Aspergillus fumigatus*, wurde mit einer Auflösung von 1,76 Å bestimmt. Die Kristallform gehört zur Raumgruppe $P2_12_12_1$ und enthält zwei Moleküle in der asymmetrischen Einheit. Die dreidimensionale Struktur zeigt eine aus α, β -Einheiten bestehende *barrel*-Struktur, die erst kürzlich erstmals in einem bakteriellen Enzym (NphB) entdeckt und Prenyltransferase-*barrel* genannt wurde. Obwohl NphB auch die Prenylierung eines aromatischen Substrats katalysiert, besitzt FgaPT2 zu diesem Enzym interessanterweise keine Sequenzähnlichkeit. Die Struktur von FgaPT2 mit dem gebundenen Substrat L-Tryptophan und dem gebundenen nicht-hydrolysierbaren Substratanalogen DMASPP konnte mit einer Auflösung von 2,2 Å ermittelt werden. Auf der Grundlage dieser Struktur wurde ein Modell zur Beschreibung einer enzymatisch katalysierten Friedel-Crafts-Alkylierung entwickelt, das auch Erklärungen für die strenge Regiospezifität der DMATS-Reaktion am C-4 und die ungewöhnliche Mg^{2+} -Unabhängigkeit des Enzyms liefert. Die Funktion einzelner Aminosäuren wurde herausgearbeitet und ein detaillierter Reaktionsmechanismus vorgeschlagen.

Die Prenyltransferase CloQ aus *Streptomyces roseochromogenes* katalysiert eine ähnliche Reaktion wie FgaPT2 und zeigt ähnliche biochemische Eigenschaften, aber keine Sequenzähnlichkeit zu FgaPT2. CloQ katalysiert die Prenylierung von 4-Hydroxyphenylpyruvat (4-HPP) mit DMAPP als Prenyldonor in der Biosynthese des Aminocoumarinantibiotikums Clorobiocin. Es wurden vier Strukturen von CloQ gelöst: CloQ mit gebundenem 4-HPP (2,5 Å), CloQ ohne Substrat (3,1 Å), CloQ mit der Mutation C215S (1,9 Å) und CloQ mit der Mutation R66S und gebundenem 4-HPP (2,2 Å). Alle Kristallformen gehören zur Raumgruppe $I4_122$. Die Raumstruktur von CloQ entspricht dem oben genannten Prenyltransferase-*barrel*. Trotz einer Vielzahl systematisch durchgeführter Tränkeexperimente gelang es nicht, das isoprenoide Substrat DMAPP in der Struktur zu zeigen. Jedoch konnte durch Sequenz- und Strukturvergleiche mit FgaPT2 und NphB eine hypothetische Bindestelle von DMAPP vorgeschlagen und durch Mutationsexperimente verifiziert werden. Die in der Röntgenstruktur eindeutig erkennbare kovalente Bindung des aromatischen Substrats mit C215 in Form einer Thiohemiketalbindung ist für die katalytische Reaktion nicht relevant, was ebenfalls durch Mutationen belegt wurde. Vermutlich ist freies 4-HPP aufgrund seiner Keto-Enol-Tautomerie in der Proteinstruktur nicht eindeutig lokalisiert.

Erst nach kovalenter Bindung der Keto-Form über die Thiohemiketalbindung kann es eindeutig dargestellt werden. Diese Hypothese wird gestützt durch die beobachtete Elektronendichte im aktiven Zentrum von CloQ-C215S (Kristall in 4-HPP-Lösung getränkt), die vermutlich auf das zwischen zwei tautomeren Formen wechselnde 4-HPP zurückzuführen ist. Durch Strukturvergleiche der CloQ-Strukturen mit den Strukturen von FgaPT2 und NphB konnte die Funktion mehrerer Aminosäuren in CloQ definiert und durch Mutationsexperimente bestätigt werden. Auch ein Reaktionsmechanismus, der ähnlich verläuft wie bei FgaPT2, konnte dadurch vorgeschlagen werden.

Die in der Literatur diskutierte Promiskuität der aromatischen Prenyltransferasen wurde auch für CloQ durch Umsetzung der nicht-genuinen Substrate L-Tyrosin ($K_m = 680 \mu\text{M}$), *p*-Cumarsäure ($K_m = 874 \mu\text{M}$) und Geranylpyrophosphat ($K_m = 307 \mu\text{M}$) beobachtet. Mit dem Vergleich der kinetischen Parameter von genuinen und artifiziellen Substraten zeigt sich jedoch ganz klar eine Präferenz für die genuinen Substrate ($K_m_{4\text{-HPP}} = 16 \mu\text{M}$, $K_m_{\text{DMAPP}} = 25 \mu\text{M}$). Die katalytische Effizienz für die Umsetzung der genuinen Substrate ist 1000-mal höher als für die artifiziellen Substrate.

Die Amidsynthetase NovL, ein Schlüsselenzym der Biosynthese des Aminocoumarinantibiotikums Novobiocin, katalysiert sowohl die Aktivierung seines Säuresubstrats durch eine Adenylierung als auch den anschließenden Acyltransfer auf die Aminogruppe des Aminocoumarinrings. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die dreidimensionale Struktur von NovL aufgeklärt werden. NovL wurde kristallisiert und ein Datensatz des Proteins mit einer Auflösung von 2,6 Å aufgenommen. Die Bestimmung der Proteinphasen war aufgrund der Zwillingsbildung der Kristalle jedoch bislang nicht möglich, trotz umfangreicher und systematischer Versuche zur Lösung dieses Problems.

Parallel zu den strukturellen Untersuchungen der Amidsynthetasen der Aminocoumarinantibiotika-Biosynthese wurden biochemische Untersuchungen an diesen Enzymen durchgeführt. Zur Untersuchung der für die Substraterkennung verantwortlichen Sequenzbereiche wurden zehn verschiedene Chimäre aus den Enzymen NovL und CouL hergestellt und deren Aktivität mit den genuinen Substraten von NovL und CouL (3-Dimethylallyl-4-hydroxybenzoessäure und 3-Methylpyrrol-2,4-dicarbonsäure) und einem artifiziellen Substrat (3-Propyl-4-hydroxybenzoessäure) untersucht. Die für die Substraterkennung verantwortlichen Bereiche liegen bei NovL zwischen den Aminosäuren 215 bis 412 und bei CouL zwischen den Aminosäuren 217 bis 414. Dies wird auch durch einen Sequenzvergleich der beiden Amidsynthetasen mit zwei Adenylierungsdomänen (DhbE und PheA) von nicht-ribosomalen Peptidsynthetasen gestützt. Mit Hilfe der Sequenzvergleiche können einzelne Aminosäuren vorgeschlagen werden, die wahrscheinlich von besonderer Bedeutung für die Substratspezifität sind: Q220/H222, I225/V227, L287/V289, L289/V291, T322/A324 und V323/M325 (NovL/CouL).

5 Literatur

Akashi T, Sasaki K, Aoki T, Ayabe S, Yazaki K (2009) Molecular cloning and characterization of a cDNA for pterocarpan 4-dimethylallyltransferase catalyzing the key prenylation step in the biosynthesis of glyceollin, a soybean phytoalexin. *Plant Physiol* 149: 683-693.

Allan RK, Mok D, Ward BK, Ratajczak T (2006) Modulation of chaperone function and cochaperone interaction by novobiocin in the C-terminal domain of Hsp90: evidence that coumarin antibiotics disrupt Hsp90 dimerization. *J Biol Chem* 281: 7161-7171.

Anderle C (2007) Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Biosynthese der Aminocoumarin-Antibiotika Novobiocin und Clorobiocin. Universitätsbibliothek Tübingen, Tübingen.

Berger J, Batcho AD, Weinstein MJ, Wagman GH (1978) Coumarin-glycoside antibiotics. In *Antibiotics. Isolation, Separation and Purification*. Vol. 15, pp 101-158. Amsterdam, Oxford, New York

Bhuyan BK, Owen SP, Dietz A (1965) Rubradirin, a new antibiotic. I. Fermentation and biological properties. *Antimicrob Agents Chemother*: 91-96.

Botta B, Monache GD, Menendez P, Boffi A (2005a) Novel prenyltransferase enzymes as a tool for flavonoid prenylation. *Trends Pharmacol Sci* 26: 606-608.

Botta B, Vitali A, Menendez P, Misiti D, Delle Monache G (2005b) Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. *Curr Med Chem* 12: 717-739.

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254.

Brauer L, Brandt W, Schulze D, Zakharova S, Wessjohann L (2008) A structural model of the membrane-bound aromatic prenyltransferase UbiA from *E. coli*. *Chembiochem* 9: 982-992.

Challis GL, Ravel J, Townsend CA (2000) Predictive, structure-based model of amino acid recognition by nonribosomal peptide synthetase adenylation domains. *Chemistry & Biology* 7: 211-224.

Chi Y, Duan J, Qi X, Chen G (2003) Electrochemical study on the keto-enol tautomerization of p-hydroxyphenylpyruvic acid in aqueous solution. *Bioelectrochemistry* 60: 37-45.

Collakova E, DellaPenna D (2001) Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and Arabidopsis. *Plant Physiology* 127: 1113-1124.

Conti E, Stachelhaus T, Marahiel MA, Brick P (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J* 16: 4174-4183.

Cress WA, Chayet LT, Rilling HC (1981) Crystallization and partial characterization of dimethylallyl pyrophosphate: L-tryptophan dimethylallyltransferase from *Claviceps* sp. SD58. *Journal of Biological Chemistry* 256: 10917-10923.

Degenhardt J, Köllner TG, Gershenzon J (2009) Monoterpene and sesquiterpene syntheses and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry* 70: 1621-1637.

Ding Y, Williams RM, Sherman DH (2008) Molecular analysis of a 4-dimethylallyltryptophan synthase from *Malbranchea aurantiaca*. *J Biol Chem* 283: 16068-16076.

Doy CH (1960) Alkaline conversion of 4-hydroxyphenylpyruvic acid to 4-hydroxybenzaldehyde. *Nature* 186: 529-531.

Edwards DJ, Gerwick WH (2004) Lyngbyatoxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. *J Am Chem Soc* 126: 11432-11433.

Eustáquio AS, Gust B, Galm U, Li SM, Chater KF, Heide L (2005) Heterologous expression of novobiocin and clorobiocin biosynthetic gene clusters. *Appl Environ Microbiol* 71: 2452-2459.

Flieger M, Wurst M, Shelby R (1997) Ergot alkaloids--sources, structures and analytical methods. *Folia Microbiol (Praha)* 42: 3-29.

French P, Venuti E, Fraimow HS (1993) In vitro activity of novobiocin against multiresistant strains of *Enterococcus faecium*. *Antimicrob Agents Chemother* 37: 2736-2739.

Galm U, Dessoy MA, Schmidt J, Wessjohann LA, Heide L (2004a) In vitro and in vivo production of new aminocoumarins by a combined biochemical, genetic, and synthetic approach. *Chem Biol* 11: 173-183.

Galm U, Heller S, Shapiro S, Page M, Li SM, Heide L (2004b) Antimicrobial and DNA gyrase-inhibitory activities of novel clorobiocin derivatives produced by mutasynthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1307-1312.

Gebler JC, Poulter CD (1992) Purification and characterization of dimethylallyl tryptophan synthase from *Claviceps purpurea*. *Arch Biochem Biophys* 296: 308-313.

Gebler JC, Woodside AB, Poulter CD (1992) Dimethylallyltryptophan synthase. An enzyme-catalyzed electrophilic aromatic substitution. *J Am Chem Soc* 114: 7354-7360.

Gouet P, Courcelle E, Stuart DI, Metz F (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* 15: 305-308.

Gröger D, Floss HG (1998) Biochemistry of ergot alkaloids - achievements and challenges. *Alkaloids Chem Biol* 50: 171-218.

Guo RT, Ko TP, Chen AP, Kuo CJ, Wang AH, Liang PH (2005) Crystal structures of undecaprenyl pyrophosphate synthase in complex with magnesium, isopentenyl pyrophosphate, and farnesyl thiopyrophosphate: Roles of the metal ion and conserved residues in catalysis. *J Biol Chem* 280: 20762-20774.

Haagen Y, Glück K, Fay K, Kammerer B, Gust B, Heide L (2006) A gene cluster for prenylated naphthoquinone and prenylated phenazine biosynthesis in *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042. *Chembiochem* 7: 2016-2027.

Haarmann T, Ortel I, Tudzynski P, Keller U (2006) Identification of the cytochrome P450 monooxygenase that bridges the clavine and ergoline alkaloid pathways. *Chembiochem* 7: 645-652.

Haug-Schifferdecker E, Arican D, Brueckner R, Heide L (2010) A New Group of Aromatic Prenyltransferases in Fungi, Catalyzing a 2,7-Dihydroxynaphthalene 3-Dimethylallyl-transferase Reaction. *Journal of Biological Chemistry* 285: 16487-16494.

Heinstein PF, Lee SI, Floss HG (1971) Isolation of dimethylallylpyrophosphate: tryptophan dimethylallyl transferase from the ergot fungus (*Claviceps spec.*). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 44: 1244-1251.

Holzenkämpfer M, Walker M, Zeeck A, Schimana J, Fiedler HP (2002) Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by *Streptomyces antibioticus* Tü 6040 - II. Structure elucidation and biosynthesis. *Journal of Antibiotics* 55: 301-307.

Jez JM, Ferrer JL, Bowman ME, Dixon RA, Noel JP (2000) Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* 39: 890-902.

Keller S, Pojer F, Heide L, Lawson DM (2006) Crystallization and preliminary X-ray analysis of the aromatic prenyltransferase CloQ from the clorobiocin biosynthetic cluster of *Streptomyces roseochromogenes*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun* 62: 1153-1155.

Koehl P (2005) Relaxed specificity in aromatic prenyltransferases. *Nat Chem Biol* 1: 71-72.

Kominek LA, Meyer HF (1975) Novobiocin acid synthetase. *Methods in Enzymology* 43: 502-508.

Konz D, Marahiel MA (1999) How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chemistry & Biology* 6: R39-R48.

Kremer A, Li SM (2008) Tryptophan aminopeptidase activity of several indole prenyltransferases from *Chem Biol* 15: 729-738.

Kremer A, Westrich L, Li SM (2007) A 7-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterization. *Microbiology* 153: 3409-3416.

Krissinel E, Henrick K (2004) Secondary-structure matching (SSM), a new tool for fast protein structure alignment in three dimensions. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 60: 2256-2268.

Kumano T, Richard SB, Noel JP, Nishiyama M, Kuzuyama T (2008) Chemoenzymatic syntheses of prenylated aromatic small molecules using *Streptomyces* prenyltransferases with relaxed substrate specificities. *Bioorg Med Chem* 16: 8117-8126.

Kuzuyama T, Noel JP, Richard SB (2005) Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature* 435: 983-987.

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

Lafitte D, Lamour V, Tsvetkov PO, Makarov AA, Klich M, Deprez P, Moras D, Briand C, Gilli R (2002) DNA gyrase interaction with coumarin-based inhibitors: the role of the hydroxybenzoate isopentenyl moiety and the 5'-methyl group of the noviose. *Biochemistry* 41: 7217-7223.

Lanoot B, Vancanneyt M, Cleenwerck I, Wang L, Li W, Liu Z, Swings J (2002) The search for synonyms among streptomycetes by using SDS-PAGE of whole-cell proteins. Emendation of the species *Streptomyces aurantiacus*, *Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi*, *Streptomyces caeruleus* and *Streptomyces violaceus*. *Int J Syst Evol Microbiol* 52: 823-829.

Lee SL, Floss HG, Heinstein P (1976) Purification and properties of dimethylallylpyrophosphate:tryptophan dimethylallyl transferase, the first enzyme of ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps* sp. SD 58. *Arch Biochem Biophys* 177: 84-94.

Lewis RJ, Singh OMP, Smith CV, Skarzynski T, Maxwell A, Wonacott AJ, Wigley DB (1996) The nature of inhibition of DNA gyrase by the coumarins and the cyclothialidines revealed by X-ray crystallography. *EMBO J* 15: 1412-1420.

Liang PH, Ko TP, Wang AH (2002) Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur J Biochem* 269: 3339-3354.

Lonicer A (1582) *Kreuterbuch*, Frankfurt am Main, Germany.

Luft T, Li SM, Scheible H, Kammerer B, Heide L (2005) Overexpression, purification and characterization of SimL, an amide synthetase involved in simocyclinone biosynthesis. *Arch Microbiol* 183: 277-285.

Macone A, Lendaro E, Comandini A, Rovardi I, Matarese RM, Carraturo A, Bonamore A (2009) Chromane derivatives of small aromatic molecules:

Chemoenzymatic synthesis and growth inhibitory activity on human tumor cell line LoVo WT. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* 17: 6003-6007.

Mantegani S, Brambilla E, Varasi M (1999) Ergoline derivatives: receptor affinity and selectivity. *Farmaco* 54: 288-296.

Marahiel MA, Essen LO (2009) Nonribosomal peptide synthetases mechanistic and structural aspects of essential domains. *Methods in Enzymology* 458: 337-351.

Marahiel MA, Stachelhaus T, Mootz HD (1997) Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chemical Reviews* 97: 2651-2674.

Marcu MG, Schulte TW, Neckers L (2000) Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90-dependent signaling proteins. *J Natl Cancer Inst* 92: 242-248.

Markert A, Steffan N, Ploss K, Hellwig S, Steiner U, Drewke C, Li SM, Boland W, Leistner E (2008) Biosynthesis and accumulation of ergoline alkaloids in a mutualistic association between *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) and a clavicipitalean fungus. *Plant Physiology* 147: 296-305.

Maxwell A (1993) The interaction between coumarin drugs and DNA gyrase. *Molecular Microbiology* 9: 681-686.

Maxwell A, Lawson DM (2003) The ATP-binding site of type II topoisomerases as a target for antibacterial drugs. *Curr Top Med Chem* 3: 283-303.

May JJ, Kessler N, Marahiel MA, Stubbs MT (2002) Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 12120-12125.

McGuffin LJ, Bryson K, Jones DT (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* 16: 404-405.

Melzer M, Heide L (1994) Characterization of polyprenyldiphosphate: 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* 1212: 93-102.

Mogi T, Saiki K, Anraku Y (1994) Biosynthesis and functional role of haem O and haem A. *Molecular Microbiology* 14: 391-398.

Ohara K, Muroya A, Fukushima N, Yazaki K (2009) Functional characterization of LePGT1, a membrane-bound prenyltransferase involved in the geranylation of *p*-hydroxybenzoic acid. *Biochemical Journal* 421: 231-241.

Ozaki T, Mishima S, Nishiyama M, Kuzuyama T (2009) NovQ is a prenyltransferase capable of catalyzing the addition of a dimethylallyl group to both phenylpropanoids and flavonoids. *Journal of Antibiotics* 62: 385-392.

- Pojer F, Li SM, Heide L (2002) Molecular cloning and sequence analysis of the clorobiocin biosynthetic gene cluster: new insights into the biosynthesis of aminocoumarin antibiotics. *Microbiology* 148: 3901-3911.
- Pojer F, Wemakor E, Kammerer B, Chen H, Walsh CT, Li SM, Heide L (2003) CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 2316-2321.
- Poulter CD (2006) Farnesyl diphosphate synthase. A paradigm for understanding structure and function relationships in E-polyprenyl diphosphate synthases. *Phytochemistry Reviews* 5: 17-26.
- Raad II, Hachem RY, Abi-Said D, Rolston KVI, Whimbey E, Buzaid AC, Legha S (1998) A prospective crossover randomized trial of novobiocin and rifampin prophylaxis for the prevention of intravascular catheter infections in cancer patients treated with interleukin-2. *Cancer* 82: 403-411.
- Ramakrishnan V, Finch JT, Graziano V, Lee PL, Sweet RM (1993) Crystal structure of globular domain of histone H5 and its implications for nucleosome binding. *Nature* 362: 219-223.
- Rappa G, Lorico A, Sartorelli AC (1992) Potentiation by novobiocin of the cytotoxic activity of etoposide (VP-16) and teniposide (VM-26). *Int J Cancer* 51: 780-787.
- Saleh O, Gust B, Boll B, Fiedler HP, Heide L (2009) Aromatic prenylation in phenazine biosynthesis: Dihydrophenazine-1-carboxylate dimethylallyltransferase from *Streptomyces anulatus*. *Journal of Biological Chemistry* 284: 14439-14447.
- Sasaki K, Mito K, Ohara K, Yamamoto H, Yazaki K (2008) Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of *Sophora flavescens*. *Plant Physiol* 146: 1075-1084.
- Schardl CL, Panaccione DG, Tudzynski P (2006) Ergot alkaloids - biology and molecular biology. *Alkaloids Chem Biol* 63: 45-86.
- Schimana J, Fiedler HP, Groth I, Süssmuth R, Beil W, Walker M, Zeeck A (2000) Simocyclinones, novel cytostatic angucyclinone antibiotics produced by *Streptomyces antibioticus* Tü 6040. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *Journal of Antibiotics* 53: 779-787.
- Schledz M, Seidler A, Beyer P, Neuhaus G (2001) A novel phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 involved in tocopherol biosynthesis. *FEBS Lett* 499: 15-20.
- Schmelz S, Naismith JH (2009) Adenylate-forming enzymes. *Current Opinion in Structural Biology* 19: 666-671.
- Schmutz E, Steffensky M, Schmidt J, Porzel A, Li SM, Heide L (2003) An unusual amide synthetase (CouL) from the coumermycin A₁ biosynthetic gene cluster from *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *European Journal of Biochemistry* 270: 4413-4419.

Schultz AW, Lewis CA, Luzung MR, Baran PS, Moore BS (2010) Functional characterization of the cyclomarin/cyclomarazine prenyltransferase CymD directs the biosynthesis of unnatural cyclic peptides. *Journal of Natural Products* 73: 373-377.

Schwarz K (1961) Separation of enol and keto tautomers of aromatic pyruvic acids by paper chromatography. *Arch Biochem Biophys* 92: 168-175.

Shaw N, Zhao M, Cheng C, Xu H, Saarikettu J, Li Y, Da Y, Yao Z, Silvennoinen O, Yang J, Liu Z-J, Wang B-C, Rao Z (2007) The multifunctional human p100 protein 'hooks' methylated ligands. *Nat Struct Mol Biol* 14: 779-784.

Shibuya M, Chou H-M, Foutoulakis M, Hassam S, Kim S-U, Konbayashi K, Otsuka H, Rogalska E, Cassady JM, Floss HG (1990) Stereochemistry of the isoprenylation of tryptophan catalyzed by 4-(γ , γ -dimethylallyl)tryptophan synthase from claviceps, the first pathway-specific enzyme in ergot alkaloid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* 1990: 297-304.

Silverman RB (2002) *The Organic Chemistry of Enzyme-Catalyzed Reactions*, San Diego, CA, USA: Academic Press.

Sohng JK, Oh TJ, Lee JJ, Kim CG (1997) Identification of a gene cluster of biosynthetic genes of rubradirin substructures in *S. achromogenes* var. *rubradiris* NRRL3061. *Mol Cells* 7: 674-681.

Stachelhaus T, Huser A, Marahiel MA (1996) Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chemistry & Biology* 3: 913-921.

Stachelhaus T, Marahiel MA (1995) Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiology Letters* 125: 3-14.

Stachelhaus T, Mootz HD, Bergendahl V, Marahiel MA (1998) Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *Journal of Biological Chemistry* 273: 22773-22781.

Stachelhaus T, Mootz HD, Marahiel MA (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chemistry & Biology* 6: 493-505.

Stec E, Steffan N, Kremer A, Zou H, Zheng X, Li SM (2008) Two lysine residues are responsible for the enzymatic activities of indole prenyltransferases from fungi. *Chembiochem* 9: 2055-2058.

Steffan N, Grundmann A, Yin WB, Kremer A, Li S-M (2009) Indole prenyltransferases from fungi: A new enzyme group with high potential for the production of prenylated indole derivatives *Curr Med Chem* 16: 218-231.

- Steffan N, Unsöld IA, Li SM (2007) Chemoenzymatic synthesis of prenylated indole derivatives by using a 4-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* 8: 1298-1307.
- Steffensky M, Li SM, Heide L (2000a) Cloning, overexpression, and purification of novobiocin acid synthetase from *Streptomyces spheroides* NCIMB 11891. *Journal of Biological Chemistry* 275: 21754-21760.
- Steffensky M, Mühlenweg A, Wang ZX, Li SM, Heide L (2000b) Identification of the novobiocin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces spheroides* NCIB 11891. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 1214-1222.
- Stuible H, Büttner D, Ehling J, Hahlbrock K, Kombrink E (2000) Mutational analysis of 4-coumarate:CoA ligase identifies functionally important amino acids and verifies its close relationship to other adenylate-forming enzymes. *FEBS Lett* 467: 117-122.
- Suvarna K, Stevenson D, Meganathan R, Hudspeth ME (1998) Menaquinone (vitamin K2) biosynthesis: localization and characterization of the *menA* gene from *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180: 2782-2787.
- Tello M, Kuzuyama T, Heide L, Noel JP, Richard SB (2008) The ABBA family of aromatic prenyltransferases: broadening natural product diversity. *Cell Mol Life Sci* 65: 1459-1463.
- Thiele A, Pfister M, Erbes M, Cross M, Hänsch M, Hauschildt S (2002) Novobiocin is a novel inducer of CD38 on cells of the myelomonocytic lineage. *Biochim Biophys Acta* 1542: 32-40.
- Tsai FTF, Singh OM, Skarzynski T, Wonacott AJ, Weston S, Tucker A, Pauptit RA, Breeze AL, Poyser JP, O'Brien R, Ladbury JE, Wigley DB (1997) The high-resolution crystal structure of a 24-kDa gyrase B fragment from *E. coli* complexed with one of the most potent coumarin inhibitors, clorobiocin. *Proteins* 28: 41-52.
- Tsai HF, Wang H, Gebler JC, Poulter CD, Schardl CL (1995) The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 216: 119-125.
- Tudzynski P, Hölter K, Correia T, Arntz C, Grammel N, Keller U (1999) Evidence for an ergot alkaloid gene cluster in *Claviceps purpurea*. *Molecular and General Genetics* 261: 133-141.
- Turgay K, Krause M, Marahiel MA (1992) Four homologous domains in the primary structure of GrsB are related to domains in a superfamily of adenylate-forming enzymes. *Molecular Microbiology* 6: 529-546.
- Unsöld I (2006) Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen der Fumigaclavinbiosynthese in *Aspergillus fumigatus* AF 293 / B 5233 und *Penicillium commune* NRRL 2033. Universitätsbibliothek Tübingen, Tübingen.

- Unsöld IA, Li SM (2005) Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 151: 1499-1505.
- Walsh TJ, Hansen SL, Tatem BA, Auger F, Standiford HC (1985) Activity of novobiocin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 15: 435-440.
- Wang ZX, Li SM, Heide L (2000) Identification of the coumermycin A₁ biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 3040-3048.
- Weber T, Marahiel MA (2001) Exploring the domain structure of modular nonribosomal peptide synthetases. *Structure* 9: R3-9.
- Williams RM, Stocking EM, Sanz-Cervera JF (2000) Biosynthesis of prenylated alkaloids derived from tryptophan. *Topics in Current Chemistry* 209: 97-173.
- Wolpert M, Heide L, Kammerer B, Gust B (2008) Assembly and heterologous expression of the coumermycin A₁ gene cluster and production of new derivatives by genetic engineering. *Chembiochem* 9: 603-612.
- Woodside AB, Huang Z, Poulter CD (1993) Trisammonium geranyl diphosphate [diphosphoric acid, mono(3,7-dimethyl-2,6-octadienyl) ester (*E*-), trisammonium salt]. *Organic Synthesis* 66: 211-211.
- Yin WB, Grundmann A, Cheng J, Li SM (2009) Acetylaszonalenin biosynthesis in *Neosartorya fischeri*: identification of the biosynthetic gene cluster by genomic mining and functional proof of the genes by biochemical investigation. *J Biol Chem* 284: 100-109.

6 Anhang

Statistik zur Verfeinerung der FgaPT2-Strukturen.

	FgaPT2	FgaPT2-Substrat-Komplex
Auflösung [Å]	25 – 1,76	20 – 2,10
R _{cryst}	0,151	0,150
R _{free} (<i>test set</i> von 3%)	0,183	0,200
Anzahl nicht-H-Atome		
Kette A / Kette B / Kette N*	3637 / 3507 / 101	3460 / 3441 / 23
Glycerin	4	2
1,3-Butandiol	8	---
Wassermoleküle	685	588
Mittlerer isotroper B-Faktor [Å ²]		
Hauptkette A / B / N*	21,7 / 26,9 / 40,0	29,7 / 33,7 / 80,0
Seitenketten A / B / N*	25,7 / 31,0 / 40,3	31,9 / 35,6 / 72,9
Glycerin	40	38,4
1,3-Butandiol	41	
Wassermoleküle	20,3	27,2
<i>rmsd</i> Bindungslängen [Å]	0,014	0,014
<i>rmsd</i> Bindungswinkel [°]	1,447	1,553
Ramachandran		
favorisierte Geometrie [%]	91,1	90,7
erlaubte Geometrie [%]	8,9	9,3
Ausreißer [%]	---	---

rmsd = mittlere quadratische Abweichung; * Die Aminosäuren der Kette N gehören zum C-Terminus, können aber nicht der A- bzw. B-Kette zugeordnet werden

Statistik zur Verfeinerung der CloQ-Strukturen.

	WT-4HPP native	Apo	C215S	R66S-4HPP
R _{cryst} (<i>test set</i> von 95%)	0,165	0,179	0,161	0,174
R _{free} (<i>test set</i> von 5%)	0,212	0,236	0,186	0,210
Koordinatenfehler (Å)	0,171	0,412	0,096	0,165
Ramachandran				
favorisierte Geometrie [%]	98,4	95,5	99,1	97,8
erlaubte Geometrie [%]	100,0	99,4	100,0	100,0
Ausreißer	0	2	0	0
<i>rmsd</i> Bindungslängen (Å)	0,016	0,015	0,016	0,017
<i>rmsd</i> Bindungswinkel (°)	1,545	1,488	1,447	1,505
mittlerer B-Faktor (Å ²)	20,6	21,9	25,7	31,9
Modell (Moleküle)				
Protein (Aminosäuren)	316	307	311	307
4-HPP	1	0	0	1
Ethylenglykol	0	0	1	1
Formiat	3	0	9	7
Wassermoleküle	236	0	260	155

rmsd = mittlere quadratische Abweichung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Menschen herzlich danken, die mich bei der Durchführung meiner Doktorarbeit unterstützt haben.

Besonders bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. L. Heide für die Vergabe des interessanten Themas, die gute und lehrreiche Betreuung, seine Ermutigungen und für seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. T. Stehle danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens, die gute Zusammenarbeit, seine stets ansteckende positive Sichtweise und für die Bereitstellung von Chemikalien und Geräten aus seinem Labor.

Herrn Prof. F. Böckler und Dr. B. Gust danke ich für ihre Bereitschaft, das Prüfungsamt zu übernehmen. Dr. B. Gust danke ich weiterhin für sein immer offenes Ohr, seine kompetenten Ratschläge und für viele interessante Diskussionen.

Prof. Dr. S.-M. Li danke ich für die Vorbereitung meines Projektes, für seine Betreuung während seiner Tübinger Zeit und die Unterstützung im FgaPT2-Projekt.

Dr. David Lawson, Dr. Clare Stevenson, Dr. Inmaculada Gómez García und Prof. Dr. A. Maxwell danke ich für eine wunderschöne und lehrreiche Zeit in Norwich.

Ganz besonders danke ich Dr. Georg Zocher, Dr. Christoph Schall und Johannes Romir für die kooperative und fruchtbare Zusammenarbeit, die wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Vielen Dank an Dr. Inge Unsöld für die Vorarbeiten zum FgaPT2-Projekt und vor allem für die ausgesprochen gute Zusammenarbeit beim Etablieren der Kristallisation in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. L. Heide.

Silke Fischer danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und für ihre großartige Arbeit, die sie in Sachen „Chimäre“ geleistet hat.

Ich danke Tobias Bonitz für seine stete Hilfsbereitschaft und Geduld in bioinformatischen Fragen, Stefanie Siebenberg für die Messung meiner LC-MS-Proben und Elisa Haug-Schifferdecker für die gute Zusammenarbeit bei der DMAPP-Synthese.

Björn Boll danke ich für die angenehme Atmosphäre in unserer gemeinsamen Laborbox und natürlich für seinen *Input* aus dem „Traumland“ Göttingen, der uns vor allem hinsichtlich der Proteinreinigung vorangebracht hat.

Susanne Hennig, Lucy Westrich, Emmanuel Wemakor, Gabi Frickmann, Frau Bauer, Herrn Trefzer, Anna, Birger, Heike und Marco danke ich für die hilfreiche

Unterstützung im Laboralltag durch das Beschaffen von Chemikalien, Enzymen, Kits und Verbrauchsmaterial, das Entsorgen des Chemikalienabfalls, das Spülen der Laborgeräte, das Spitzenstecken und das Bereitstellen von Medien und Lösungen.

Corinna Fischer danke ich für ihre Arbeit als „Admin“, ihre Diskretion und ihre stete Hilfsbereitschaft nicht nur in Computerfragen.

Ein ganz großer Dank geht an alle meine Laborkollegen, die die Arbeit im Labor zu einer schönen und persönlich bereichernden Zeit gemacht haben. Ich danke Anja, Anna, Alessandra, Alex, Frau Bauer, Birger, Björn, Christine, Corinna, Elisa, Emmanuel, Gabi, Hanli, Hayang, Heike, Inge, Jitka, Johannes, Katrin, Katharina, Kerstin R., Kerstin S., Kristian, Kornelia, Lena, Leo, Lilly, Lucy, Manu, Marco, Herrn Mechler, Nici, Peter, Philipp, Orwah, Silke A., Silke F., Steffi, Susanne, Tobias, Herrn Trefzer, Valentina, Volker, Xiaoyu, Xinqing und Yvonne für die Hilfsbereitschaft, das Nachfragen und Kümmern, die Diskussionen im Teeraum und einigen davon für die gute Freundschaft, die entstanden ist.

All meinen Freunden und Verwandten danke ich von ganzem Herzen für ihr Verständnis, wenn ich mal wieder keine Zeit hatte, für ihre Aufmunterungen, für Postkarten und „Care-Pakete“, fürs Zuhören, fürs Aufzeigen anderer Sichtweisen und ganz besonders für die vielen schönen gemeinsamen Stunden, die wir in den letzten Jahren miteinander verbracht haben.

Markus und Ida, meinen Eltern, Petra, Michael, Charlotte und Julius, gilt mein größter Dank. Sie sind mir das Wertvollste was ich habe.

Akademische Lehrer

Universität Tübingen

Prof. Dr. K. Albert	Prof. Dr. L. Heide	Prof. H. Oßwald
Prof. Dr. C.-F. Bardele	Prof. Dr. H. Heinle	Prof. Dr. H. Probst
Dr. E. O. Bayer	Dr. F. Iglauer	Prof. Dr. U. Quast
Prof. Dr. H. Bisswanger	Prof. Dr. W. Jäger	Prof. Dr. K. Reutter
Prof. Dr. K. W. Bock	Dr. C. Köhle	Dr. W. Sarrazin
Prof. Dr. P. Bohley	PD Dr. G. Luippold	Prof. Dr. H. Schott
Prof. Dr. Dr. U. Breyer-Pfaff	Prof. Dr. N. Kuhn	Prof. Dr. M. Schwarz
Dr. A. Buchmann	Prof. Dr. S.-M. Li	Prof. Dr. T. Stehle
Prof. Dr. R. Dringen	Prof. Dr. F. Madeo	Dr. G. Steinbrück
Prof. Dr. M. Duszenko	Prof. Dr. M. E. Maier	Prof. Dr. R. Süssmuth
Prof. Dr. K. Eisele	Prof. Dr. D. Mecke	PD Dr. S. Verleysdonk
PD Dr. B. Gust	PD Dr. P. Münzel	Prof. Dr. J. Werringloer
Prof. Dr. B. Hamprecht	Prof. Dr. H. Ninnemann	Prof. Dr. W. Wohlleben

Fachhochschule Reutlingen

Prof. Dr. J. Biermann	Prof. Dr. W. Honnen	Prof. Dr. R. Kuhn
Prof. Dr. S. Blösl	Prof. Dr. R. Kessler	Prof. Dr. D. Mayer
Prof. Dr. P. Epple	Prof. W. Kessler	Prof. Dr. G. Rösch
A. Grundei-Blösl	Prof. K. Knöpke	Dr. S. Tabibi
Prof. Dr. D. Frahne	Dr. D. Kratsch	Prof. Dr. J. Wurster

Lebenslauf

Ute Metzger

geboren am 9. Januar 1974 in Backnang

- 09/2005 – 07/2010 Doktorarbeit
Prof. Dr. Lutz Heide
Pharmazeutische Biologie
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 01/2008 – 03/2008 Forschungsaufenthalt am John Innes Centre
Dr. David M. Lawson
Biological Chemistry Department
John Innes Centre, Norwich, England
- 09/2004 – 04/2005 Diplomarbeit
Prof. Dr. Michael Schwarz
Institut für Pharmakologie u. Toxikologie
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 10/2001 – 08/2004 Studium der Biochemie
Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 04/1998 – 11/2001 Validierungsmitarbeiterin
Biopharmazeutische Qualität & Entwicklung
GMP & Compliance
Boehringer Ingelheim Pharma KG, Biberach
- 08/1997 – 01/1998 Diplomarbeit
ATU GmbH, Sindelfingen
- 09/1993 – 07/1997 Studium der Chemie
Fachhochschule Reutlingen
Hochschule für Technik und Wirtschaft, Reutlingen
- 05/1993 Abitur
Maria-Merian-Schule, Waiblingen