Biologische Untersuchungen zum "lower acyclic terpene utilisation (atu) pathway" in Pseudomonas aeruginosa und chemische Synthese wichtiger Intermediate dieses Stoffwechselweges

von der Fakultät für Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigte Abhandlung

vorgelegt von Nadine Randel aus Magdeburg

Hauptberichter: Prof. Dr. Dieter Jendrossek Mitberichter: Prof. Dr. Bernd Plietker Tag der mündlichen Prüfung: 14. September 2012

Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart, 2012

Die experimentellen Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden unter der Leitung von Prof. Dr. D. Jendrossek am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart und unter Leitung von Prof. Dr. B. Plietker am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart durchgeführt.

Inhaltsverzeichnis

Inł	altsverzeichnis	3
Ab	kürzungsverzeichnis	8
4		10
1.	Zusammenfassung	13
	Abstract	17
2.	Einleitung	20
	2.1. Die Biotechnologie – Zusammenspiel der Wissenschaften	20
	2.2. Werkzeuge der Biotechnologie – Die Enzyme	23
	2.3. Enzyme – Bedeutung in der Wissenschaft	25
	2.4. Vorkommen von Terpenen	28
	2.5. Bedeutung der Terpene	30
	2.6. Abbau von Terpenen	31
	2.7. Ziele dieser Arbeit	38
3.	Material und Methoden	41
	3.1. Organismen und Plasmide	41
	3.2. Kultivierung von Bakterien	42
	3.2.1. Vollmedium für E. coli	42
	3.2.2. Mineralmedium nach Schlegel et al. (1961)	43
	3.2.3. Medienzusätze	44
	3.2.4. Anzucht von <i>E. coli</i> -Stämmen	45
	3.2.5. Messung des Bakterienwachstums	45
	3.2.6. Zellernte	45
	3.2.7. Stammhaltung	46
	3.3. Isolierung von Nukleinsäuren	46
	3.3.1. Isolierung von chromosomaler DNA aus P. aeruginosa	46
	3.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA (Sambrook et al., 1989)	47
	3.3.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli mittels Spin-Präparation	48
	3.4. Standardmethoden für das Arbeiten mit Nukleinsäuren	48
	3.4.1. Fällung von Nukleinsäuren	48
	3.4.2. Standard-Agarose-Gelelektrophorese	49
	3.4.3. DNA-Größenbestimmung	49
	3.4.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	50

3.4.5. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen	50
3.4.6. Dephosphorylierung von DNA	51
3.4.7. Ligation	51
3.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	51
3.5.1. PCR mit Pwo-bzw Pfu- DNA Polymerase	52
3.5.2. PCR mit <i>Prime</i> STAR [™] HS DNA Polymerase	52
3.5.3. PCR mit <i>Taq</i> -DNA Polymerase	53
3.5.4. Oligonukleotidprimer	54
3.5.5. Kolonie-PCR	57
3.5.6. Reinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen	57
3.6. Herstellung und Selektion rekombinanter E. coli-Klone	58
3.6.1. Herstellung von lagerungsfähigen kompetenten Zellen	58
3.6.2. Herstellung von kompetenten Zellen nach Chung et al. (1989)	58
3.6.3. Transformation	58
3.6.4. Selektion rekombinanter <i>E. coli</i> -Klone	59
3.7. Methoden der DNA-Analyse	59
3.7.1. Sequenzierung	59
3.7.2. Auswertung der Sequenzdaten	59
3.8. Proteinchemische Methoden	60
3.8.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976), modifiziert	60
3.8.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
3.8.2.1. Herstellung von Polyacrylamidgelen	61
3.8.2.2. Probenvorbereitung und Auftrag	62
3.8.2.3. Elektrophoresebedingungen	62
3.8.2.4. Farbung von Polyacrylamidgelen	63
3.8.2.6. Größenbestimmung von Proteinhenden im SDS. Gel mittels P. Wert	03 63
3.8.3. Umpuffern von Proteinlösungen	64
3.8.4 Konzentrierung von Proteinlösungen	64
3.8.5. Transfer von Proteinen auf Membranen – Western-Blot	65
3.8.5.1. Nachweis der Biotin-haltigen Untereinheit von Proteinen	66
3.8.5.2. Nachweis von His-Tag Fusionsproteinen	67
3.9. Induktion der Proteinsynthese und Gewinnung von Wildtypproteinen	67
3.9.1. Anzucht von Pseudomonas	67
3.9.2. Zellaufschluss von Pseudomonas	68
3.9.3. Aufreinigung von Biotin-haltigen Proteinen	68
3.10. Heterologe Expression und rekombinante Synthese von Proteinen	69
3.10.1. His-Tag Fusionsproteine	69
3.10.2. Durchführung einer Testexpression	69
3.10.3. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte	70
3.10.4. Zellaufschluss und Gewinnung des Rohextraktes	70

	3.10.5. Proteinreinigung über Nickel-NTA Agarose 3.10.5.1. Aufreinigung über <i>Gravi-Flow</i> -Säulchen	71 71
	3.10.5.2. Aufreinigung über FPLC	73
	3.11. Synthese von CoenzymA-Estern	74
	3.12. Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	75
	3.12.1. Trennung von CoA-Estern	75
	3.12.2. Trennung von Nukleotiden	77
	3.13. HPLC-(ESI)-MS Analyse von CoA Verbindungen	78
	3.14. Messung von Enzymaktivitäten	79
	3.14.1. Messung der Citronellyl-CoA Dehydrogenase	79
	3.14.2. Messung der Geranyl-CoA- und der Methylcrotonyl-CoA Carboxlase	79
	3.14.3. Messung der Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase	80
	3.14.3.1. Kopplung von GCase und Hydratase	80
	3.14.3.2. Messung der Hydratase analog zu Feil (2006 modifiziert)	81 81
	3 14 4 Messung der Hexokinase Reaktion	81
	3.14.5. Berechnung der spezifischen Enzym-Aktivität	82
	3.15. Chemikalien	83
	3.16. Chemische Methoden	83
	3.16.1 Analytik	83
	3.16.2 Chromatographie	84
	3.16.3 Reagenzien und Lösungen	85
4.	Ergebnisse	86
	4.1. Isolierung der Wildtyp-Carboxylasen aus P. aeruginosa und P. citronellolis	s 8 6
	4.2. Versuche zur Bestimmung der Enzymaktivität von Wildtyp-Carboxylasen	88
	4.3. Heterologe Expression der Carboxylasen aus P. aeruginosa in E. coli	101
	4.3.1. Klonierung der codierenden Sequenzen der Carboxylase-Untereinheiten unter Verwendung des Vektorsystems ploe4036 1	101
	4.3.2. Expression und Synthese von rekombinantem Enzym in <i>E. coli</i>	101
	4.3.3. Klonierung der GCase Untereinheiten vergleichbar zum	107
	MCase-Konstrukt	113
	4.3.4. Expression des atuCDEF Konstruktes und Reinigung des	
	rekombinanten Proteins	115
	4.3.5. Klonierung der codierenden Sequenzen der Geranyl-CoA Carboxylase	. .
	unter Verwendung des Vektorsystems pCOLA Duet -1	119
	4.3.6. Expression der pCOLA-Konstrukte und Aufreinigung der synthetisierten Proteine	122
	synthetisterten i rotente	144

4.4. Versuche zur Bestimmung von Enzymaktivitäten der rekombinanten	
Carboxylasen	127
4.4.1. Untersuchung der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Aktivität	128
4.4.2. Untersuchung der Geranyl-CoA Carboxylase Aktivität	130
4.4.2.1. Untersuchung der pJoe4036.1::atuCF Konstrukte	131
4.4.2.2. Untersuchung der pJoe4036.1::atuCDEF Konstrukte	133
4.4.3. Untersuchung der Carboxylasen mit Hilfe der rekombinanten	
Acyl-CoA Dehydrogenasen	134
4.4.4. Versuche zur Bestimmung von Enzymaktivitäten unter Verwendung	
von cis- und trans-Geranyl-CoA als Substrate	136
4.5. Klonierung und Expression von Genen des Atu-Weges - Synthese und	
Reinigung weiterer rekombinanter Proteine in E. coli	141
4.5.1. Klonierung und Expression von <i>atuD</i> und Reinigung des Proteins AtuD	142
4.5.2. Versuche zur Bestimmung von Enzymächvitäten der	1/6
4.5.3 Klonierung und Expression von <i>atuE</i> und Reinigung des Proteins AtuE	140
4.5.4 Versuche zur Bestimmung der Enzymaktivitäten der	177
Isohexenvl-glutaconvl-CoA Hydratase	151
4.5.4.1. Untersuchung der Hydratase über Kopplung der Reaktion mit der	
GCase Reaktion	151
4.5.4.2. Untersuchung der Hydratase mit Hilfe des synthetisierten Substrates	ļ
Isohexenyl-glutaconyl-CoA	153
4.5.4.3. Untersuchung der Hydratase analog zu Feil (2006, modifiziert)	154
4.5.5. Klonierung und Expression von atuA und Reinigung des Proteins AtuA	155
4.5.6. Versuche zur Bestimmung einer möglichen Lyase Aktivität	158
4.5.7. Klonierung und Expession von <i>liuE</i> und Aufreinigung des Proteins LiuE	159
4.6. Kristallisation der Hydratase AtuE und der möglichen Lyase AtuA	161
4.7. Untersuchungen der Enzymreaktionen mittels HPLC	162
4.7.1. Trennung verschiedener CoA-Estern mittels HPLC	162
4.7.2. Verfolgen von Enzymreaktionen über HPLC und HPLC-(ESI)-MS	
Analyse	168
4.7.2.1. Reaktionen mit Citronellyl-CoA (Citronellyl-CoA Dehydrogenase)	169
4.7.2.2. Reaktionen mit Geranyl-CoA (Geranyl-CoA Carboxylase)	173
4.7.2.3. Reaktionen mit Methylcrotonyl-CoA	
(Methylcrotonyl-CoA Carboxylase)	176
4.7.3. Nachweis der Carboxylase Reaktion über den Nachweis der Nukleotide	178
4.7.4. Umsatzberechnung der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Reaktion	185
4.8. Darstellung wichtiger Intermediate zur Betrachtung des	
"lower atu pathways"	187
4.8.1. Malonsäurediethylesterroute (Weg A)	192
4.8.2. Acetonid-geschützte β-Ketosäureroute (Weg B)	199
4.8.3. Aceton-dicarbonsäure-diethylesterroute (Weg C)	216

	 4.8.4. Geranylsäureroute (Weg D) - Syntheseplan in Anlehnung des in der Natur ablaufenden Weges 4.8.5. Darstellung von Vorstufen der Intermediate des "<i>lower atu pathways</i>" 4.8.5.1. Trennung von <i>cis</i>- und <i>trans</i>-Geranylsäure und Darstellung der 	217 224
	Vorstufe des Geranyl-CoA Carboxylase Substrates	224
	4.8.5.2. Darstellung der Vorstufe des Hydratase-Substrates	226
	4.8.5.3. Darstellung der Vorstufe des Hydratase-Produktes/Lyase-Substrates	229
	4.8.6. Zusammenfassung	230
	4.9. Experimentelle Teil	239
	 4.9.1. Darstellung der Verbindungen der Malonsäurediethylesterroute (Weg A) 4.9.2. Darstellung der Verbindungen der Acetonid-geschützten ß Ketosäureroute (Weg B) 	239
	4.9.3. Darstellung der Verbindungen der Geranylsäureroute (Weg D)	2 4 5 256
		200
5.	Diskussion	273
	5.1. Situation in <i>P. aeruginosa</i>	273
	5.2. Aktivität der Wildtyp Geranyl-CoA Carboxylase	277
	5.3. Klonierung von Genen des Atu- und Liu Weges	287
	5.3.1. Klonierung von Einzelgenen	287
	5.3.2. Klonierung der Carboxylasen	289
	5.4. Aktivität der rekombinanten Enzyme aus E. coli	301
	5.4.1. Citronellyl-CoA Dehydrogenase – AtuD	301
	5.4.2. Geranyl-CoA Carboxylase – AtuC/AtuF &	
	Methylcrotonyl-CoA Carboxylase LiuB/LiuC	303
	5.4.3. Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase - AtuE	306
	5.4.4. 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase - AtuA?	316
	5.5. <i>high performance liquid chromatography</i> zum Nachweis einer	220
	Carboxylase-Aktivitat	328
6.	Literaturverzeichnis	334
	Danksagung	353
	Lebenslauf	354

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Atom-Absorptions-Spektrometrie
Abb.	Abbildung
ACase	Acetyl-CoA Carboxylase
ACoA	Acetyl-CoA
ad	bis zum angegebenen Volumen auffüllen
ADP	Adenosin-5´-diphosphat
Alloc-chlorid	Allylchlorformiat
AMP	Adenosin-5´-monophosphat
Amp ^r	Ampicillin-Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-5´-triphosphat
АТРН	Aluminium-Tris-2,6-diphenylphenoxid
atu	<u>a</u> cyclic <u>t</u> erpene <u>u</u> tilisation
BC	Biotin Carboxylase
BCCP	Biotin-Carboxyl-Carrier Protein
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat-p- toluidinsalz
BF ₃ Et ₂ O	Bortrifluoridetherat
Bn	Benzyl
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
Bu	Butyl
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -Butyllithium
С	Citronellol
C Cam ^r	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz
C Cam ^r CCoA	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA
C Cam ^r CCoA CCoA-DH	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase
C Cam ^r CCoA CCoA-DH CDCl ₃	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase Chloroform D
C Cam ^r CCoA CCoA-DH CDCl ₃ CoA	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase Chloroform D CoenzymA
C Cam ^r CCoA CCoA-DH CDCl ₃ CoA CO ₂	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase Chloroform D CoenzymA Kohlenstoffdioxid
C Cam ^r CCoA CCoA-DH CDCl ₃ CoA CO ₂ C-Quelle	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase Chloroform D CoenzymA Kohlenstoffdioxid Kohlenstoff-Quelle
C Cam ^r CCoA CCoA-DH CDCl ₃ CoA CO ₂ C-Quelle Cs	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase Chloroform D CoenzymA Kohlenstoffdioxid Kohlenstoff-Quelle Citronellsäure
C Cam ^r CCoA CCoA-DH CDCl ₃ CoA CO ₂ C-Quelle Cs CT	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase Chloroform D CoenzymA Kohlenstoffdioxid Kohlenstoff-Quelle Citronellsäure Carboxyltransferase
C Cam ^r CCoA CCoA-DH CDCl ₃ CoA CO ₂ C-Quelle Cs CT	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase Chloroform D CoenzymA Kohlenstoffdioxid Kohlenstoff-Quelle Citronellsäure Carboxyltransferase
C Cam ^r CCoA CCoA-DH CDCl ₃ CoA CO ₂ C-Quelle Cs CT Da DC	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase Chloroform D CoenzymA Kohlenstoffdioxid Kohlenstoffdioxid Kohlenstoff-Quelle Citronellsäure Carboxyltransferase Dalton Dünnschichtchromatographie
C Cam ^r CCoA CCoA-DH CDCl ₃ CoA CO ₂ C-Quelle Cs CT Da DC DCC	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase Chloroform D CoenzymA Kohlenstoffdioxid Kohlenstoff-Quelle Citronellsäure Carboxyltransferase Dalton Dünnschichtchromatographie Dicyclohexylcarbodiimid
C Cam ^r CCoA CCoA-DH CDCl ₃ CoA CO ₂ C-Quelle Cs CT Da DC DCC DCM	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase Chloroform D CoenzymA Kohlenstoffdioxid Kohlenstoff-Quelle Citronellsäure Carboxyltransferase Dalton Dünnschichtchromatographie Dicyclohexylcarbodiimid Dichlormethan
C Cam ^r CCoA CCoA-DH CDCl ₃ CoA CO ₂ C-Quelle Cs CT Da DC DCC DCC DCM DCPIP	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase Chloroform D CoenzymA Kohlenstoffdioxid Kohlenstoff-Quelle Citronellsäure Carboxyltransferase Dalton Dünnschichtchromatographie Dicyclohexylcarbodiimid Dichlormethan 2,6-Dichlorphenol-indophenol
C Cam ^r CCoA CCoA-DH CDCl ₃ CoA CO ₂ C-Quelle Cs CT Da DC DCC DCC DCM DCPIP dest.	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase Chloroform D CoenzymA Kohlenstoffdioxid Kohlenstoff-Quelle Citronellsäure Carboxyltransferase Dalton Dünnschichtchromatographie Dicyclohexylcarbodiimid Dichlormethan 2,6-Dichlorphenol-indophenol destilliert
C Cam ^r CCoA CCoA-DH CDCl ₃ CoA CO ₂ C-Quelle Cs CT Da DC DCC DCC DCM DCPIP dest. DH	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase Chloroform D CoenzymA Kohlenstoffdioxid Kohlenstoff-Quelle Citronellsäure Carboxyltransferase Dalton Dünnschichtchromatographie Dicyclohexylcarbodiimid Dichlormethan 2,6-Dichlorphenol-indophenol destilliert Dehydrogenase
C Cam ^r CCoA CCoA-DH CDCl ₃ CoA CO ₂ C-Quelle Cs CT Da DC DCC DCC DCM DCPIP dest. DH DMAP	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase Chloroform D CoenzymA Kohlenstoffdioxid Kohlenstoff-Quelle Citronellsäure Carboxyltransferase Dalton Dünnschichtchromatographie Dicyclohexylcarbodiimid Dichlormethan 2,6-Dichlorphenol-indophenol destilliert Dehydrogenase <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin
C Cam ^r CCoA CCoA-DH CDCl ₃ CoA CO ₂ C-Quelle Cs CT Da DC DCC DCC DCM DCPIP dest. DH DMAP DMF	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase Chloroform D CoenzymA Kohlenstoffdioxid Kohlenstoff-Quelle Citronellsäure Carboxyltransferase Dalton Dünnschichtchromatographie Dicyclohexylcarbodiimid Dichlormethan 2,6-Dichlorphenol-indophenol destilliert Dehydrogenase <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin <i>N,N</i> -Dimethylformamid
C Cam ^r CCoA CCoA-DH CDCl ₃ CoA CO ₂ C-Quelle Cs CT Da DC DCC DCC DCM DCPIP dest. DH DMAP DMF DMSO	Citronellol Chloramphenicol-Resistenz Citronellyl-CoA Citronellyl-CoA Dehydrogenase Chloroform D CoenzymA Kohlenstoffdioxid Kohlenstoff-Quelle Citronellsäure Carboxyltransferase Dalton Dünnschichtchromatographie Dicyclohexylcarbodiimid Dichlormethan 2,6-Dichlorphenol-indophenol destilliert Dehydrogenase <i>N,N</i> -Dimethylaminopyridin <i>N,N</i> -Dimethylformamid Dimethylsulfoxid

DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleotid-5´-triphosphat
D ₂ O	Deuteriumoxid
DTT	Dithiotreithol
EA	Ethylacetat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsaure
El	electron impact ionisation, ElektronenstoBionisation
eq.	Aquivalent(e)
ESI	electron spray ionisation, Elektronensprayionisation
Et	Ethyl
Et ₂ O	Diethylether
et <i>al</i> .	und Mitarbeiter
FAD/FADH	Flavinadenindinukleotid
FPLC	fast protein liquid chromatography
~	West mal Fudbaschlaunigung
g C	Coronial
6	Geranioi
	Gaschromatographie
GCase	Geranyl-CoA Carboxylase
GCOA	Geranyl-CoA
Glu	Glukose
Gs	Geranylsäure
h	Stunde(n)
ЗНА	3-Hydroxy-alkanoat
HHG-CoA Lyase	3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA
HMG-CoA Lyase	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Lyase
HPLC	high-performance liquid chromatography,
	Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie
HRMS	high resolution mass spectrometry, Hochaufgelöste
	Massenspektrometrie
HRP	horse radish peroxidase
HV	Hochvakuum
HWE-Reaktion	Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion
ICoA	Jeovaleryl CoA
	Isovaleryl-CoA Dehydrogenase
	Isobayanyi glutaconyi CoA
IIIG-COA Hydrotoso	Isohavanul alutaconul CoA Hudrotoco
Into-Con Hydratase	Isomonyl 0 this selectory and it
	Isopropyi-p-thiogalactopyranosid
	Infrarotspektroskopie
Iso	Isovaleriansäure
J	Kopplungskonstante

K _{0.5}	Affinitätskonstante für Nicht-Michaelis-Menten kinetisches
	Verhalten
Kan ^r	Kanamycin-Resistenz
Kat.	Katalysator
kb	Kilobasenpaare
konz.	konzentriert(e)
LB	Luria-Bertani
LDA	Lithium-di-iso-propylamin
LDH	Lactat Dehydrogenase
LiHMDS	lithiertes deprotoniertes Hexa-methyl-disilazan
liu	<u>l</u> eucine/ <u>i</u> sovalerate <u>u</u> tilisation
LTMP	Lithium-2,2,6,6-tetramethylpiperid-Lösung
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption ionization time-of flight
	mass spectrometry
mAU	Milliabsorptionseinheiten
MCase	Methylcrotonyl-CoA Carboxylase
MCoA	Methylcrotonyl-CoA
mcs	multi cloning sites
Me	Methyl
Me ₃ Al	Trimethylaluminium
MeOH	Methanol
$(Me_3O)BF_4$	Trimethyl-oxonium-tetrafluorborat
min	Minute(n)
MS	Massenspektrometrie
MW	Mikrowelle
m/z	Masse zu Ladung Verhältnis
$NAD^+/NADH + H^+$	Nicotinamidadenindinukleotid
$NADP^{+}/NADPH + H^{+}$	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaH	Natriumhydrid
NaOMe	Natriummethanolat
NBT	p-Nitrotetrazoliumblauchlorid
NMR	nuclear magnetic resonance, Kernspin-Resonanz
Nr.	Nummer
OD	optische Dichte
ORF	open reading frame (offener Leserahmen)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBu ₃	Tri-n-butylphosphin
PCase	Propionyl-CoA Carboxylase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Petrolether
PEG	Polyethylenglycoll
PEP	Phosphoenolpyruvat
PHA	Polyhydroxyalkanoate
РК	Pyruvatkinase
PMS	Phenazinmethosulfat

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPh ₃	Triphenylphosphin
ppm	parts per million
R	Rest
RBS	Ribosomenbindestelle
RE	Rohextrakt
R _f	Retentionsfaktor
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
Sdp.	Siedepunkt
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
sec	Sekunde
Smp.	Schmelzpunkt
SV	Säulenvolumen
4 / 44	4
	Tonnon neo John
	Tonnen pro Janr
Tab.	
TBE	Tris-Borsaure-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	N', N', N', N'-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetracyclin
TFA	Trifluoressigsäure
THF	Tetrahydrofuran
Tm	Schmelztemperatur
TMS-Cl	Trimethylsilylchlorid
Tol	Toluol
Tris	Tris-Hydroxymethyl-aminomethan
II.	Unit (Einhoit der Enzymaktivität, umol/min)
	Untersinheit
	Ultraviolett
	ühen Nacht
u.in.	uber Nacht
v. I.	vor Induktion
v/v	Volumen pro Volumen
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
W/V	Masse pro Volumen
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoyl-β-galactosid

Ala	А	Leucin	Leu	L
Arg	R	Lysin	Lys	Κ
Asn	Ν	Methionin	Met	Μ
Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cys	С	Prolin	Pro	Р
Gln	Q	Serin	Ser	S
Glu	E	Threonin	Thr	Т
Gly	G	Tryptophan	Trp	W
His	Н	Tyrosin	Tyr	Y
Ile	Ι	Valin	Val	V
	Ala Arg Asn Asp Cys Gln Glu Gly His Ile	AlaAArgRAsnNAspDCysCGlnQGluEGlyGHisHIleI	AlaALeucinArgRLysinAsnNMethioninAspDPhenylalaninCysCProlinGlnQSerinGluEThreoninGlyGTryptophanHisHTyrosinIleIValin	AlaALeucinLeuArgRLysinLysAsnNMethioninMetAspDPhenylalaninPheCysCProlinProGlnQSerinSerGluEThreoninThrGlyGTryptophanTrpHisHTyrosinTyrIleIValinVal

Abkürzungen für Aminosäuren:

1. Zusammenfassung

Der Abbau von Citronellol und verwandten azyklischen Terpenoiden ist aufgrund einer Methylgruppe in β -Position schwierig und nicht weit verbreitet. Die Organismen *P. aeruginosa* und *P. citronellolis* umgehen die Blockierung der β -Oxidation durch Carboxylierung dieser Methylgruppe auf Stufe des CoenzymA-Esters **19** (Abb. 1.1, Schritt 1). Durch Wasseranlagerung an die Doppelbindung (**21**, Abb. 1.1, Schritt 2) wird die Voraussetzung für die Abspaltung der Acetat-Funktionalität geschaffen (Abb. 1.1, Schritt 3), wobei die resultierende Verbindung **23** folgend weiter über β -Oxidation abgebaut werden kann.

- In Rohextrakten von Citronellsäure (Cs)-gewachsenen P. aeruginosa PAO1 Zellen wurde eine spezifische Geranyl-CoA Carboxylase (GCase) Aktivität von 11 ± 6 mU/mg und eine spezifische Methylcrotonyl-CoA Carboxylase (MCase) Aktivität von 47 ± 11 mU/mg bestimmt. Rohextrakte von Isovaleriansäure (Iso)gewachsenen Zellen enthielten 54 ± 22 mU/mg MCase Aktivität.
- 2. Eine über Avidin-Chromatographie gereinigte Präparation an Biotin-Carboxylasen wies MCase Aktivität in Höhe von 4600 ± 966 mU/mg (Iso-Zellen) bzw. von 1900 ± 1200 mU/mg (Cs-Zellen) auf. GCase Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden, obwohl die entsprechenden Untereinheiten mittels SDS-PAGE und Western-Blot gezeigt wurden.
- 3. Die α und β Untereinheiten der MCase und GCase wurden rekombinant in *E. coli* synthetisiert und partiell gereinigt. Eine Bestimmung der Aktivität beider Carboxylasen mit den selbsthergestellten CoA-Substraten konnte aber nur mit Methylcrotonyl-CoA für die MCase erfolgen (2700 ± 126 mU/mg). Mit der rekombinanten GCase und Geranyl-CoA **19** bzw. Methylcrotonyl-CoA **29** konnte dagegen keine Aktivität bestimmt werden.
- Neben den Carboxylasen wurden auch AtuD (Citronellyl-CoA Dehydrogenase), AtuE (Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase, IHG-CoA Hydratase) und AtuA (potentielle 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase, HHG-CoA Lyase) rekombinant exprimiert und als His-*Tag* Fusionsproteine aus *E. coli* Rohextrakten gereinigt.

- 5. Für AtuD konnte Citronellyl-CoA Dehydrogenase Aktivität sowohl über einen optischen Enzymassay (464 ± 9,9 mU/mg) als auch über den Nachweis des Reaktionsproduktes mittels HPLC-(ESI)-MS gezeigt werden. Eine Isolierung des so bereitgestellten *cis*-Geranyl-CoAs **19a**, als Produkt der Dehydrogenase, aus dem Reaktionsansatz war jedoch nicht möglich. Auch eine Kopplung des Assays mit dem Carboxylase Assay und somit ein möglicher direkter Umsatz des gebildeten *cis*-GCoAs **19a** über die Geranyl-CoA Carboxylase war nicht erfolgreich.
- 6. Die gereinigten rekombinanten Proteine AtuE (IHG-CoA Hydratase) und AtuA (mögliche HHG-CoA Lyase) wurden in erste Kristallisationsversuche eingesetzt. Für AtuE konnte kürzlich die Struktur mit 2,3 Å Auflösung gelöst werden (persönliche Mitteilung Dr. Papageorgiou, Turku Center of Biotechnology, Finnland). Für AtuA liegen zurzeit noch keine brauchbaren Kristalle vor.

Der geplanten biochemischen Analyse beider Enzyme stand die Nichtverfügbarkeit der entsprechenden Substrate Isohexenyl-glutaconyl-CoA (IHG-CoA, **20**) und 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA (HHG-CoA, **21**) entgegen. Der Versuch das Substrat der Hydratase enzymatisch über die Reaktion der vorangestellten Geranyl-CoA Carboxylase zu generieren scheiterte.

Im Verlauf der chemischen Arbeiten gelang es allerdings eine Vorstufe des AtuE-Substrates **94** darzustellen. Der notwendige CoA-Ester **20** wurde entsprechend den Substraten der Carboxylasen synthetisiert. Eine Aktivität von nativem und rekombinantem AtuE als IHG-CoA Hydratase konnte unter den hier gewählten Bedingungen allerdings noch nicht gezeigt werden.

Eine Funktion von AtuA als vermutliche HHG-CoA Lyase konnte in dieser Arbeit aufgrund des fehlenden Substrates **21** nicht untersucht werden.

- Die 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA Lyase LiuE (HMG-CoA Lyase) wurde als rekombinantes His-*Tag* Fusionsprotein aus *E. coli* gereinigt und steht f
 ür biochemische Analysen zur Verf
 ügung.
- Eine Trennung des *cis/trans* Isomerengemisches der Geranylsäure 8 war erst nach Überführung dieser in die jeweiligen Methylester 115a bzw. 115b möglich. Beide Methylester können nun als Referenzen für folgende Metabolit-Analysen dienen. Eine Verseifungsreaktion lieferte die isomerenreinen Säuren (8a, 8b) und nach der CoA-Ester Synthese auch *cis*- und *trans*-Geranyl-CoA (19a, 19b).

- 9. Unter Verwendung des Geranylsäuremethylesters 115 konnte erstmals eine Vorstufe des Hydratase-Substrates 125 in hoher Ausbeute dargestellt werden. Eine Trennung der beiden Doppelbindungsisomere (125a, 125b) gelang über semi-präparative HPLC. Diese Methylester stehen nun ebenfalls als Referenzverbindungen zur Verfügung. Durch Verseifung konnte die racemische Dicarbonsäure 94 und nach Synthese des CoA-Esters erstmalig auch das racemische Hydratase-Substrat 20 erhalten werden. Eine mögliche stereospezifische Hydroxylierung durch das Enzym Isohexenylglutaconyl-CoA Hydratase (AtuE) konnte nicht untersucht werden, da die hier dargestellten Isomere der Vorstufe (125a, 125b) nicht in die CoA-Ester Synthese eingesetzt werden konnten.
- 10. Versuche eine Vorstufe des Hydratase-Produktes/Lyase-Substrates darzustellen, waren nicht erfolgreich, jedoch konnten Daten erhalten werden, welche auf eine Instabilität der Verbindung 104 als eine Vorstufe des HHG-CoAs 21 hindeuten. Dies könnte bedeuten, dass auch das Substrat 21 der Lyase selbst nicht stabil ist und somit *in vivo* nur als kurzlebiges Intermediat vorliegt. Das 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA (HHG-CoA, 21) ist für weitere Untersuchungen somit bislang nicht verfügbar. Im Gegensatz dazu gelang es erstmalig eine Vorstufe des Lyase-Produktes darzustellen. Dieser Methylester 133 steht nun ebenfalls als Referenzverbindung für anschließende Untersuchungen zur Verfügung.





(1: Geranyl-CoA Carboxylase (AtuC/AtuF); 2: Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase (AtuE); 3: 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase (potentielles *atuA* Genprodukt); A: Erhalt der Geranyl-CoA Carboxylase Aktivität in dieser Arbeit unter Verwendung von Rohextrakten aus *P. aeruginosa* und *P. citronellolis* (Cs- und Iso-Zellen); B: keine Hydratase-Aktivität unter Verwendung von Wildtypenzym (Rohextrakte) und rekombinanten, gereinigtem AtuE aus *E. coli*)

Abstract

The degradation of citronellol and related acyclic terpenoid molecules is difficult due to a methyl group in β -position and not widely spread. *P. aeruginosa* and *P. citronellolis* circumvent the blocking of the β -oxidation by modifying this methyl group. During the "lower atu pathway" the methyl group of the coenzyme A ester **19** is first carboxylated (Fig. 1.1, step 1). By hydration of the double bound (**21**, Fig. 1.1, step 2) the conditions for the cleavage of the acetate functionality are established (Fig. 1.1, step 3). The resulting compound **23** can then be further degraded by β -oxidation.

- 1. In crude extracts of sodium citronellate (Cs)-grown *P. aeruginosa* PAO1 cells a specific geranyl-CoA carboxylase (GCase) activity of 11 ± 6 mU/mg and a specific methylcrotonyl-CoA carboxylase (MCase) activity of 47 ± 11 mU/mg was detected. Crude extracts of isovaleric acid (Iso)-grown cells showed MCase activity of 54 ± 22 mU/mg.
- 2. A by avidin-chromatography purified preparation of biotin-carboxylases showed MCase activity in an amount of 4600 ± 966 mU/mg (Iso cells) and of 1900 ± 1200 mU/mg (Cs cells). GCase activity could not be detected, even though the corresponding subunits were shown by SDS-PAGE and Western-Blot.
- 3. The α and β subunits of the MCase and GCase were synthesized recombinantly in *E. coli* and partially purified. A determination of the activity of both carboxylases with the self-made CoA-substrates could be done only with methylcrotonyl-CoA for the MCase (2700 mU/mg ± 126 mU/mg). In contrast with the recombinant GCase and geranyl-CoA **19** or methylcrotonyl-CoA **29** no activity could be determined.
- 4. In addition to the carboxylases AtuD (citronellyl-CoA dehydrogenase), AtuE (isohexenyl-glutaconyl-CoA hydratase, IHG-CoA hydratase) and AtuA (potential 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:acetate lyase, HHG-CoA lyase) were recombinantly expressed as his-tag fusion proteins and purified from *E. coli* crude extracts.

- 5. For AtuD the citronellyl-CoA dehydrogenase activity could be shown by an optical enzyme assay ($464 \pm 9,9 \text{ mU/mg}$) and also by detecting the reaction product by HPLC-(ESI)-MS. An isolation of the so provided *cis*-geranyl-CoA **19a**, as the product of the dehydrogenase, from the reaction mixture was not possible. Also a coupling of the assay with the carboxylase assay, and thus a possible direct turnover of the resulting *cis*-GCoA **19a** by the geranyl-CoA carboxylase was not successful.
- 6. The purified recombinant proteins AtuE (isohexenyl-glutaconyl-CoA hydratase) and AtuA (putative 3-hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:acetate lyase) were used in crystallization experiments. Recently, for AtuE the structure was resolved at 2.3 Å (personal communication, Dr. Papageorgiou, Turku center of biotechnology, finland). For AtuA are currently still no usable crystals available.

The planned biochemical analysis of both enzymes was finally opposed by the nonavailability of the appropriate substrates isohexenyl-glutaconyl-CoA (IHG-CoA, **20**) and 3-hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA (HHG-CoA, **21**). The attempt to generate the substrate of the hydratase enzymatically by the reaction of the preceding geranyl-CoA carboxylase failed.

In the course of the chemical works a precursor of the AtuE substrate **94** was successfully obtained. The necessary CoA ester **20** was synthesised according to the substrates of the carboxylases. However, an activity of native and recombinant AtuE as IHG-CoA hydratase could not be shown yet under the chosen conditions.

The function of AtuA presumed HHG-CoA lyase could not be studied in this work due to the lack of substrate **21**.

- 7. The 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA lyase LiuE (HMG-CoA lyase) was purified as recombinant his-tag fusion protein from *E. coli* crude extract. Further biochemical analyses are now possible.
- 8. A separation of the *cis/trans* isomers of geranic acid 8 was possible only after the conversion of these into the respective methyl ester 115a and 115a. Both methyl esters can now serve as references for the following metabolite analysis. Saponification resulted in the isomerically pure acids (8a, 8b) and after the CoA ester synthesis the *cis* and *trans* geranyl-CoA (19a, 19b) were available.

- 9. Using the geranic acid methyl ester 115 a precursor of the hydratase substrate 125 could be shown in high yield for the first time. A separation of the two double bond isomers (125a, 125b) was carried out by semi-preparative HPLC. These methyl esters are now available as reference compounds. Through saponification the racemic dicarboxylic acid 94 and after the synthesis of the CoA ester the racemic hydratase substrate 20 were obtained for the first time. A possible stereospecific hydroxylation by the enzyme isohexenyl-glutaconyl-CoA hydratase (AtuE) couldn't be investigated, because the shown isomers of the precursor (125a, 125b) couldn't be used in the CoA ester synthesis.
- 10. Attempts to synthesise a precursor of the hydratase product/lyase substrate were made but not successful. Data that indicate an instability of the compound 104 as a precursor of the HHG-CoA 21 were obtained. This could imply that the substrat 21 of the lyase itself is not stable in vivo and thus is present only as a short-lived intermediate. Therefore the 3-hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA (HHG-CoA, 21) is currently not available for further investigations. In contrast a precursor of the lyase product 133 was synthesised for the first time. This methyl ester 133 is now also available as a reference compound for subsequent investigations.

2. Einleitung

2.1. Die Biotechnologie - Zusammenspiel der Wissenschaften

Die Biotechnologie ist eine interdisziplinäre Wissenschaft. Sie untersucht die Möglichkeiten, Enzyme, Zellen, aber auch ganze Organismen für technische Anwendungen und Problemstellungen zu nutzen bzw. nutzbar zu machen. Dabei werden Erkenntnisse aus vielen Bereichen verwendet (Abb. 2.1). Neben dem Wissenschaftsgebiet der Biologie mit der Mikrobiologie, Molekularbiologie und Genetik, sind auch die Biochemie, Chemie, Bioinformatik und die Ingenieurswissenschaften von großer Bedeutung.



Abb. 2.1: Wissenschaftsgebiete, deren Erkenntnisse für die Biotechnologie eine wesentliche Rolle spielen (schematische Darstellung, BVT: Bio- und CVT: Chemieverfahrenstechnik)

Der Begriff Biotechnologie ist dabei sehr weit gefasst. Je nach Anwendungsgebiet unterscheidet man verschiedene Zweige (Abb. 2.2). Diese Unterteilung ist jedoch aufgrund von Überschneidungen nicht immer eindeutig. Die rote und grüne Biotechnologie sind über ihre Anwendungsbereiche Medizin und Pharmazie bzw. Landwirtschaft und Ernährung relativ deutlich definiert. Dagegen ist der Begriff blaue Biotechnologie nicht über ein eigenes Anwendungsgebiet, sondern durch die Gemeinsamkeit in der Verwendung mariner Organismen gekennzeichnet.

Für das tägliche Leben eines Jeden gewinnt die Biotechnologie immer mehr an Bedeutung, auch wenn dies nicht immer wahrnehmbar ist. In vielen Haushaltsprodukten, Nahrungsmitteln, Medikamenten und Chemikalien steckt Biotechnologie. Hierzu zählen viele Lebensmittel, wie Brot, Käse, Wein und Bier, welche schon seit Jahrhunderten mit Hilfe von Mikroorganismen hergestellt werden. Die Methoden der weißen Biotechnologie sind aber zudem auch ein fester Bestandteil bei der Herstellung hochwertiger Chemikalien, Arzneimittel, Vitamine, Wasch- und Reinigungsmittel sowie bei der Veredelung von Textilien, Leder und Papier (Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), 2008).



Abb. 2.2: Schematische Darstellung der Anwendungsgebiete der Biotechnologie, unter Nichtberücksichtigung von Überschneidungen nach Braun et *al.*, 2006

Laut offizieller Definition der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD, www.oecd.org) versteht man unter dem Begriff weiße oder industrielle Biotechnologie: *The application of science and technology to living organisms, as well as parts, products and models thereof, to alter living or non-living materials for the production of knowledge, goods and services.* (Statistical Definition of Biotechnology, 2005)

Während bei den ersten Anwendungen 6000 v. Chr. die beteiligten Mikroorganismen noch völlig unbekannt waren, werden in der modernen Biotechnologie gezielt die Methoden der Molekularbiologie genutzt. Im Zentrum der Forschungsarbeiten, beispielsweise bei der BASF, stehen neue enzymkatalysierte Produkte und Prozesse, die Entwicklung neuer biobasierter Produkte und die stärkere Nutzung nachwachsender Rohstoffe beispielsweise für die Herstellung von Polymeren (www.basf.com).

Die weiße Biotechnologie lässt sich in zwei Technologiefelder, die Fermentation und die Biokatalyse unterteilen. Bei der Fermentation werden ganze, lebende Mikroorganismen und ihre Stoffwechselleistungen genutzt. So setzen z.B. Pilze oder Mikroorganismen die zugeführten Rohstoffe in das gewünschte Produkt um. Milchsäure, Vitamine, Enzyme und andere wichtige Produkte lassen sich so in großen Mengen industriell produzieren (Tab. 2.1). Bei der Biokatalyse dagegen wird ein einzelnes Enzym eingesetzt, um einen bestimmten Reaktionsschritt zu katalysieren (einige Produkte in Tab. 2.2). Auch wenn an dieser Stelle oft die Verwendung von ganzen Zellen möglich ist (Ganzzellkatalyse), so muss dass nötige Enzym doch meist zunächst aus dem Mikroorganismus isoliert und für die entsprechende Anwendung optimiert werden. Eine wesentliche Rolle in der industriellen Biotechnologie spielen also die Enzyme und ihre Leistungen.

	Produkt	Weltjahres- produktion (t/a)	Hauptanwendung	
Aminosäuren	L-Glutamat	1.500.000	Geschmacksverstärker	
	L-Lysin	700.000	Futtermittelzusatz	
	L-Threonin	30.000	Futtermittelzusatz	
	L-Phenylalanin	10.000	Aspartam, Medizin	
	L-Tryptophan 1.		Futtermittel, Ernährung	
	L-Arginin	1.000	Medizin, Kosmetik	
	L-Cystein	500	Lebensmittel, Pharma	
Säuren	Zitronensäure	1.000.000	Medizin, Lebensmittel,	
			Metall, Waschmittel	
	Essigsäure	190.000	Lebensmittel	
	Milchsäure	150.000	Lebensmittel, Leder, Textil	
	Gluconsäure	100.000	Lebensmittel, Textil, Metall,	
			Bau	
Lösungsmittel	Bioethanol	18.500.000	Lösungsmittel,	
			Grundchemikalie,	
			Energieträger	
Antibiotika	Penicilline	45.000	Medizin, Futtermittelzusatz	
	Cephalosporine	30.000	Medizin, Futtermittelzusatz	
	Tetracycline	5.000	Medizin	
Biopolymere	Polylactid	140.000	Verpackung	
	Xanthan	40.000	Erdölförderung, Lebensmittel	
	Dextran (-derivate)	2.600	Blutersatzstoff	
Vitamine	Vitamin C	80.000	Pharma, Lebensmittel,	
	(Ascorbinsäure)		Futtermittel	
	L-Sorbose (Vitamin C	50.000	Pharma, Lebensmittel	
	Vorstufe)			
	Riboflavin (B ₂)	30.000	Wirkstoff, Futterzusatz	

 Tab. 2.1:
 Durch fermentative Prozesse gewonnene Produkte der weißen Biotechnologie nach DECHEMA, 2004

	Produkt	Weltjahres- produktion (t/a)	Hauptanwendung
Aminosäuren	L-Asparaginsäure	13.000	Aspartam Herstellung
	L-Alanin	500	Infusionslösung
	L-Methionin	400	Infusionslösung
Lebensmittel	Glukose	20.000.000	Flüssigzucker,
			Fermentationsmedium
	Isomalt	70.000	Zuckeraustauschstoff
	Fructooligosaccharide	10.500	Präbiotikum
	Aspartam	10.000	Süßstoff
Zwischenprodukte	(S)-2-	2.000	Herbizidsynthese
und Chiralika	Chlorpropionsäure		
	Ethyl (S)-4-Chlor-3-	>150	Cholesterinsenker, wie z.B.
	hydroxybutyrat		Atorvastatin
Wirkstoff	Ephedrin	1500	Pseudoephedrin, chirales
(-vorstufen)			Auxiliar
	Progesteron	200	Wirkstoff
Spezialprodukte	Cyclodextrine	5.000	Haushalt, Lebensmittel,
			Stabilisatoren

Tab. 2.2:	Durch Biokatalyse und Biotransformation gewonnene Produkte der weißen Biotechnologie
	nach DECHEMA, 2004

2.2. Werkzeuge der Biotechnologie – Die Enzyme

Ein Großteil aller großtechnischen Prozesse in der chemischen Industrie wird mittels Katalysatoren gesteuert. Viele spezifische Katalysatoren für die jeweiligen Zwecke wurden von Chemikern entwickelt. Traditionell handelt es sich um Metalle, hauptsächlich Edelmetalle wie z.B. Platin, Palladium, Rhodium, und metallorganische Verbindungen. Während Edelmetalle teuer sind und ihre Verfügbarkeit begrenzt ist, sind metallorganische Verbindungen als Katalysatoren zum Teil meist durch einen relativ aufwendigen Herstellungsprozess gekennzeichnet. Neben dem daraus resultierenden hohen Preis, sind diese Verbindungen oft toxisch und empfindlich gegen Luft und Wasser. Da neben gewünschten Produkten auch Nebenprodukte als Abfall produziert werden, sind diese häufig aufwendig zu entsorgen. Somit arbeiten nicht alle Katalysatoren effizient, wirtschaftlich und umweltfreundlich. Wieder andere können ihre Wirkung erst bei hohen Temperaturen oder in Lösungsmitteln, welche oft giftig sind, erzielen. Letztendlich bedeutet dies alles einen Mehraufwand an Energie und Rohstoffen und führt zu Belastungen der Umwelt (Braun et *al.*, 2006).

Enzyme dagegen werden in den lebenden Zellen aller Lebewesen, ob Mensch, Tier, Pflanze oder Mikroorganismus gebildet. Enzyme sind vorrangig Proteine. Sie sind essentiell für den Stoffwechsel aller lebenden Organismen, da der Großteil der biochemischen Reaktionen, von der Verdauung über den Energiestoffwechsel der Zellen, die Bewegung oder die Informationsübertragung bis hin zum Vervielfältigen der Erbinformation, von Enzymen gesteuert wird. Neben der großen Vielzahl natürlicher Enzyme ist somit auch das breite Spektrum ihrer Fähigkeiten sehr beeindruckend. Es handelt sich um Katalysatoren in biologischen Systemen. Als Proteine bestehen die Enzyme aus Aminosäureketten. Sie können einerseits metallfrei sein, andererseits organische Cofaktoren oder "essentielle Metalle" wie z.B. Zink enthalten. Hauptmerkmale sind ihre katalytische Aktivität und ihre Spezifität, welche auf ihrer dreidimensionalen Struktur beruht. Eine weitere Eigenschaft stellt ihre Regulierbarkeit dar. Diese ist eine erforderliche Vorraussetzung für die Steuerung der vielen energie-verbrauchenden Stoffumwandlungsprozesse innerhalb einer Zelle.

Bei der Katalyse der verschiedensten chemischen Reaktionen erreichen Enzyme eine hohe Effektivität. Diese geht aus der Fähigkeit hervor, ein breites Spektrum an Molekülen binden zu können. Durch die Nutzung aller Arten von intermolekularen Kräften (Van-der-Waals Kräfte, Ionen- und Dipolkräfte, Wasserstoffbrücken) werden die Substrate in die optimale Orientierung zueinander gebracht und somit die Vorraussetzungen für das Knüpfen sowie Aufbrechen von chemischen Bindungen geschaffen. Reaktionen werden im Prinzip durch die Stabilisierung des entsprechenden Übergangszustandes (energiereichste chemische Spezies im Reaktionsmechanismus) katalysiert. Diese Stabilisierung erfolgt sehr selektiv, wodurch das Enzym, welches innerhalb der Zelle in einem Gemisch sehr ähnlicher Verbindungen vorliegt, bestimmt, welche von verschieden möglichen Reaktionen abläuft (Stryer, 1996).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Metallkatalysatoren im Gegensatz zu Enzymen in der Lage sind, verschiedenste Edukte umzusetzen und folglich die unterschiedlichsten Reaktionen zu katalysieren. Aufgrund der geringen Spezifität entstehen jedoch mehr Nebenprodukte in den chemischen Reaktionen. Enzyme dagegen setzten konkrete Edukte sehr spezifisch und unter milden Reaktionsbedingungen um. Sie arbeiten dabei häufig chemound stereoselektiv. Nebenprodukte treten bei enzymatischen Reaktionen im Vergleich zu den Reaktionen in der Metallkatalyse nicht oder in weitaus geringerem Maße auf.

2.3. Enzyme – Bedeutung in der Wissenschaft

In der Molekularbiologie werden Enzyme bzw. die von ihnen katalysierten Stoffwechselwege näher untersucht. Um ihre Funktion zu prüfen, werden meist die entsprechenden Gene aus dem Wildtyp-Organismus isoliert und über ein Expressionssystem in einen meist besser handhabbaren Laborstamm eingebracht. Dadurch ist normalerweise die Produktion von größeren Mengen an Protein für eine Vielzahl von weiteren Untersuchungen möglich. So ist man in der Lage, neue Proteine/Enzyme mit noch unbekannter Funktion zu charakterisieren. Auch noch ungeklärte Stoffwechselwege oder Teilabschnitte von diesen können näher untersucht werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, Enzyme durch eine gerichtete Evolution im Reagenzglas durch Mutation und Selektion so zu verändern, dass sie veränderte Enzymaktivitäten hervorbringen (Schneider et al., 2008; Schneider et al., 2010). Noch anwendungsorientierter wird es, wenn Enzyme aus verschiedenen Organismen dafür genutzt werden, einen ganzen Stoffwechselweg in einem Organismus zu verändern bzw. neu zu etablieren, sodass entweder neue Substrate und Rohstoffe von diesem gentechnisch veränderten Organismus umgesetzt werden können oder damit neue Synthesen in diesem möglich werden (Albermann et al., 2008; Albermann et al., 2010; Albermann, 2011). Fächerübergreifend wird diese anwendungsorientierte Forschung auch von Wissenschaftlern anderer Fachrichtungen betrieben (Reetz, 2010; Gröger et al., 2006a, Gröger et al., 2006b, Holzwarth et *al.*, Manuskript in Vorbereitung).

Auf dem Gebiet der industriellen Anwendung bieten Enzyme gegenüber chemischen Reaktionen und Verfahren eine Reihe von Vorteilen. Sie beschleunigen als Biokatalysatoren kaum wahrnehmbare chemische Reaktionen um ein Viel-millionenfaches. Sie sind an das Milieu lebender Zellen angepasst und reagieren somit in wässrigen Lösungen, bei Normaldruck und bei Raumtemperatur bzw. ca. 37 °C. Enzymatische Verfahren benötigen im Unterschied zu klassischen Prozessen in der Chemie weder organische Lösungsmittel, noch den Zwang extremer Hitze oder Drücke. Im Allgemeinen sind sie weniger energieintensiv. Weiterhin arbeiten sie unter weitgehender Vermeidung von Neben- und Abfallprodukten und es kommen, darüber hinaus deutlich weniger zum Teil giftige stöchiometrische Reagenzien zum Einsatz. Ferner arbeiten Enzyme effektiv und präzise. Diese Eigenschaften machen sie für viele technische Anwendungen interessant. Neben einer Vielzahl von Enzymen, welche in der Lebensmittelindustrie eingesetzt werden, steigt auch der Bedarf in vielen weiteren Industriezweigen, um Alternativen für zum Teil umweltbelastende chemische Prozesse sowie Wirkstoffe zu finden. So sind z.B. Enzyme (Amylasen, Lipasen, Proteasen) in fast allen Markenwaschmitteln enthalten und spalten hier hartnäckige Stärke-, Fett-, oder Eiweißflecken bei niedrigen Waschtemperaturen, wodurch erhebliche Energieeinsparungen ermöglicht werden. Weiter finden Enzyme in der Medizin Anwendung, z.B. in der Therapie und medizinischen Diagnostik, sowie bei der Herstellung von medizinischen Wirkstoffen. In der Papier- und Zellstoffindustrie ersetzen Enzyme das aggressive sowie umweltschädliche Chlor als Bleichmittel und in der Lederverarbeitung helfen sie beim Beizen, Entwollen und Enthaaren von Häuten und Fellen (www.transgen.de).

Die wachsende Bedeutung der Biotechnologie gilt auch immer mehr für die chemische Industrie. Schon jetzt werden in zunehmenden Maße Grundchemikalien mit Hilfe biotechnologischer Verfahren hergestellt. Bei diesen sogenannten Grundchemikalien handelt es sich in der chemischen Industrie um alle Produkte, von denen jährlich mehr als 10.000 Tonnen (t/a) produziert werden. Viele dieser biotechnologisch hergestellten Chemikalien werden in der Lebensmittel-, Genussmittel- und Futtermittelindustrie verwendet. Glutaminsäure, Zitronensäure oder Vitamin C seien an dieser Stelle als sehr erfolgreiche Beispiele genannt. Dagegen zeigt das Beispiel des Aromastoffes Vanillin, dass sich die Umstellung von etablierten chemischen Verfahren auf biotechnologische Produktionsprozesse erst bei einem günstigen Kosten-Nutzen Verhältnis rechnet (BMBF, 2008).

Die größten Wachstumsraten prognostizieren Experten bei den Produkten der Feinchemie. Darunter werden Substanzen mit einem hohen Funktionalisierungsgrad verstanden, welche in Volumina von weltweit weniger als 10.000 Tonnen pro Jahr produziert werden. Diese Verbindungen verfügen gewöhnlich über mehrere Reaktionszentren, wodurch auch oftmals die Darstellung von Enantiomeren möglich ist. Klassische Synthesewege beinhalten daher mehrere Reaktionsschritte und erfordern häufig den Einsatz einer aufwendigen Schutzgruppen-Chemie, teure und zum Teil giftige Edelmetall/Schwermetallkatalysatoren sowie drastische Reaktionsbedingungen (Braun et *al.*, 2006). Die Biokatalyse erlaubt an dieser Stelle die Synthese komplexer Verbindungen unter wesentlich milderen Bedingungen. Zu den wichtigen Feinchemikalien gehören Antibiotika und ihre Zwischenprodukte. Ihre chemische Struktur ist meist komplex. Da es keine chemischen Synthesealternativen gibt, werden sie überwiegend über biotechnologische Verfahren hergestellt (Braun et *al.*, 2006). Experten gehen davon aus, dass bis zum Jahr 2015, bei der Produktion von bis zu 60 % aller Feinchemikalien mindestens ein biokatalytischer Schritt beteiligt sein wird (Riese & Bachmann, 2004; Festel, 2006). Eine weitere Herausforderung an die Chemie ist die Nachfrage an Katalysatoren, welche enantioselektive Stoffumwandlungen ermöglichen, denn viele der heutigen Medikamente und sonstigen Wirkstoffe sind chiral. So nutzt z.B. die BASF bereits Biokatalysatoren unter anderem zur Herstellung von chiralen Zwischenprodukten, welche wiederum für die Produktion von Medikamenten und Pflanzenschutzmitteln benötigt werden (www.basf.de).

Ob eine Verbindung als Racemat oder als eines der Enantiomere vorliegt, kann insofern wichtig sein, als dass Enantiomere zwar die gleichen physikalischen (Ausnahme: optische Aktivität) und chemischen (Ausnahme: ihr Reaktionsvermögen in stereoselektiven Reaktionen), aber oft unterschiedliche physiologische Eigenschaften aufweisen. Zum Beispiel riecht D-(+)-Carvon nach Kümmel, L-(-)-Carvon dagegen nach Minze; D-(-)-Leucin schmeckt süß, L-(+)-Leucin jedoch bitter (http://de.wikipedia.org/wiki/Racemat). Wichtig ist eine Unterscheidung der Eigenschaften in der Pharmakologie. Wie wichtig es sein kann, dass wirklich nur ein Enantiomer als Produkt vorliegt, zeigt das tragische Beispiel des Pharmazeutikums Thalidomid, welches Mitte der 50er Jahre als Wirkstoff im Medikament Contergan auf den Markt gekommen war. Dabei handelte es sich um das Racemat, also einer Mischung aus beiden Enantiomeren (1a, 1b). Frauen brachten nach einer Einnahme von Contergan während der Schwangerschaft vermehrt Neugeborene mit starken Missbildungen zur Welt (Roth, 2005; http://de.wikipedia.org/wiki/Thalidomid). Aufgrund tierexperimenteller Untersuchungen wird vermutet, dass das R-Enantiomer des Thalidomids 1a die gewünschte positive Wirkung als Schlaf- und Beruhigungsmittel besitzt, die spiegelbildliche S-Form 1b dagegen teratogen wirkt (Abb. 2.3). Für die praktische Anwendung ist dieser Befund jedoch ohne Bedeutung, da sich beide Formen nach Einnahme innerhalb weniger Minuten im Organismus wieder in eine Mischung aus (S)- und (R)-Enantiomer umwandeln (Roth, 2005).



Abb. 2.3: Darstellung von (*R*)- und (*S*)-Thalidomid als Bespiel für Enantiomere (http://de.wikipedia.org/wiki/Thalidomid)

Schon lange haben die verschiedensten Enzyme den Weg in die technische Anwendung gefunden und werden dort erfolgreich eingesetzt. In den Enzymen und ihrer Vielseitigkeit liegt das große Potential der Biokatalyse und damit der Biotechnologie. Von in der Natur vorkommenden geschätzten über 10.000 Enzymen sind heute lediglich ca. 3.000 bekannt. Industriell genutzt werden nur ca. 120. Als wichtigste natürliche Enzymquelle sind von ca. über 4,5 Millionen Arten von Mikroorganismen erst ca. 100.000 bekannt (Braun et *al.*, 2006). Da Mikroorganismen in allen Lebensräumen der Natur, im Wasser, in der Luft und im Boden zu finden sind, ist eine systematische Suche nach neuen Organismen von Interesse. Neben dem Hauptaugenmerk auf sogenannten extremophilen Bakterien, also Bakterien, welche sich durch Anpassung an extreme Umweltbedingungen besondere Lebensräume erschlossen haben, sollten auch Organismen mit besonderen Stoffwechselleistungen eine Rolle spielen. Zu diesen gehören z.B. *Pseudomonas citronellolis* und *Pseudomonas aeruginosa*. Diese Organismen sind neben wenigen anderen in der Lage, azyklische Terpenoide wie Citronellol und Geraniol als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle zu verwerten (Cantwell et *al.*, 1978; Schaeffer et *al.*, 1979). Während die Synthese von Terpenen sehr gut untersucht ist, war

2.4. Vorkommen von Terpenen

der Abbau dieser Substanzen lange Zeit unklar.

Lange schon ist bekannt, dass Nadelhölzer und Zitrusfrüchte, aber auch Eukalyptus, Lavendel, Nelken, Pfefferminzarten, Rosen und viele andere Pflanzen bzw. deren Teile (Wurzeln, Rhizome, Stängel, Blätter, Blüten, Früchte, Samen) charakteristische, meist angenehme Düfte verbreiten, würzig schmecken oder bestimmte pharmakologische Wirkungen entfalten. Diese Eigenschaften werden überwiegend durch Terpene bewirkt. Sie sind in der Natur weit verbreitet, vor allem in Pflanzen als Bestandteile der ätherischen Öle (Nuhn, 2006), aber auch im Reich der Insekten als sogenannte Pheromone.

Terpene bilden eine stark heterogene Gruppe von natürlich vorkommenden chemischen Verbindungen. Der Baustein dieser Verbindungen ist der Kohlenwasserstoff Isopren $CH_2=C(CH_3)-CH=CH_2$ (*Isoprenregel;* Wallach, 1887; Ruzicka, 1963). Neben einer großen Variation an Kohlenstoffgerüsten zeichnen sie sich durch eine geringe Anzahl an funktionellen Gruppen aus (Breitmaier, 1999). Viele Terpene sind reine Kohlenwasserstoffe, jedoch kommen auch entsprechende Alkohol-, Glycosid-, Ether-, Aldehyd-, Keton-, Carbonsäure- und Esterverbindungen (Terpenoide) in der Natur vor. Unterteilt werden sie in verschiedene Klassen je nach Anzahl der Isopreneinheiten. Monoterpene bestehen aus zwei, Sesquiterpene aus drei, Diterpene aus vier, Triterpene aus sechs und Tetraterpene aus acht

Isopreneinheiten. Beispiele für Monoterpene sind: Citronellol 2, Geraniol 3a und Nerol 3b, aber auch Citral (4a und 4b), Campher 5, Menthol 6 und Limonen 7 (Abb. 2.4). Dabei handelt es sich bei Citronellol 2, Geraniol 3a und Nerol 3b um wichtige azyklische Terpenalkohole, wohingegen die Geranylsäure 8 eine wichtige azyklische Terpencarbonsäure darstellt. Menthol 6 und Limonen 7 sind Vertreter der monozyklischen Terpene, Campher 5 einer der bizyklischen Terpene. Beispiele für Sesquiterpene sind die ebenfalls in der Abbildung 2.4 gezeigten Verbindungen Nerolidol 9 und Farnesol 10.



Abb. 2.4: Graphische Darstellung einiger Mono- und Sesquiterpene

Phytol **11** und Vitamin A_1 **12** stellen zwei Beispiele für Diterpene dar und sind in der Abbildung 2.5 dargestellt.



Vitamin A₁ (Retinol) 12

Abb. 2.5: Graphische Darstellung von Phytol 11 und Vitamin A₁ 12

Als ein Beispiel für ein Triterpen sei Squalen **13** genannt und bei Carotin (Provitamin A₁) **14** handelt es sich um ein Tetraterpen. Als ein Vertreter der Polyisoprene sei an dieser Stelle Naturkautschuk **15** (Abb. 2.6, Kull, 1993, www.wikipedia.org) angeführt.



Naturkautschuk cis-Polyisopren15Abb. 2.6:Graphische Darstellung weiterer im Text genannter Terpene

2.5. Bedeutung der Terpene

Nur lückenhaft ist die biologische Funktion der Terpene bekannt. Viele Pflanzen bilden flüchtige Terpene, um Insekten zur Bestäubung anzulocken, andere dagegen um Fraßfeinde zu vertreiben. Weniger flüchtige, jedoch toxische Terpene schützen die Pflanzen ebenfalls vor Fraßfeinden. Terpene spielen nicht zuletzt als Signalstoffe und Wachstumsregulatoren der Pflanzen (Phytohormone) eine Rolle. Viele Insekten verwerten, die mit der pflanzlichen Nahrung aufgenommenen Terpene zu Entwicklungshormonen und Pheromone. Diese Lockund Signalstoffe dienen der Kommunikation der Insekten mit ihren Artgenossen.

Daraus lassen sich Verwendungsmöglichkeiten als umweltfreundliche Insektizide ableiten, indem Schadinsekten mit ihren arttypischen Pheromonen in die Falle gelockt werden. Die als ätherische Öle bekannten Extrakte aus Pflanzen dagegen werden als Rohstoffe in der Parfümerie, zur Geschmacks- und Duftveredelung von Speisen und Getränken, sowie zur Herstellung pflanzlicher Arzneimittel (Phytopharmaka) verwendet.

In der Medizin könnten Terpene aufgrund ihrer Anti-Tumor Wirkung auf Säugerzellen (Burke et *al.*, 1997; Burke et *al.*, 2002) oder der unterstützenden Wirkung für Chemotherapeutika (Carnesecchi et *al.*, 2002a; Carnesecchi et *al.*, 2002b; Carnesecchi et *al.*, 2004; Duncan et *al.*, 2004) eine Rolle spielen. Des Weiteren zeigen einige Terpenoide antimikrobielle, antifungizide, antivirale, antihyperglycemische, antiinflammatorische und antiparasitäre Wirkungen (Hammer et *al.*, 1999; Paduch et *al.*, 2007; Bakkali et *al.*, 2008; Förster-Fromme & Jendrossek, 2010b). Ferner können sie Vorstufen und *building blocks* für Synthesen komplexer chiraler Verbindungen in der chemischen und pharmazeutischen Industrie darstellen. Hierfür sind jedoch lediglich wenige Terpenoide in großen Mengen und

zu einem angemessenen Preis erhältlich. Dadurch gewinnt die Charakterisierung von geeigneten Biokatalysatoren, welche spezifisch für Terpenoid-Verbindungen sind und die Entwicklung von Umwandlungsprozessen von Terpenoiden zu kommerziell interessanten Derivaten immer mehr an Bedeutung (Förster-Fromme & Jendrossek, 2010b).

2.6. Abbau von Terpenen

Während die Synthese von Terpenen über den Mevalonat-Weg (MVA) bzw. über den Mevalonat-unabhängigen Weg (Deoxyxylulose-5-phosphate (DXP)- bzw. 2C-methyl-Derythritol-4-phosphat (MEP)-Weg (Phillips et *al.*, 2008)) sehr gut untersucht ist (Spurgeon & Porter, 1981; Rohmer et *al.*, 1993; Lange et *al.*, 2000; Rohdich et *al.*, 2003; Chang & Keasling, 2006), war der Abbau dieser Substanzen für die Wissenschaft lange nicht von Interesse.

Der Abbau von Citronellol und Geraniol, als zwei Modellverbindungen für azyklische Terpenoide, wurde erstmals Anfang der 60iger Jahre durch Seubert und Mitarbeiter untersucht (Seubert, 1960; Seubert et *al.*, 1963; Seubert & Remberger, 1963; Seubert & Fass, 1964a; Seubert & Fass, 1964b). Seubert isolierte *Pseudomonas citronellolis* über dessen Fähigkeit, Citronellol und verwandte Substanzen als alleinige Energie- und Kohlenstoffquelle nutzen zu können (Seubert, 1960). Nach der Isolierung verschiedenster Zwischenprodukte und der Aufreinigung von Enzymen konnte für diesen Mikroorganismus ein Abbauweg vorgeschlagen werden (Seubert & Fass, 1964b). Aufgrund des Vorhandenseins einer Methylgruppe in β -Position, durch die eine β -Oxidation blockiert wird, ist der Abbau von linearen Terpenen schwierig und nicht weit verbreitet. Ein Abbau konnte lediglich in *Pseudomonas citronellolis, Pseudomonas mendocina* und *Pseudomonas aeruginosa* (Cantwell et *al.*, 1978; Schaeffer et *al.*, 1979; Fall et *al.*, 1979; Tozoni et *al.*, 2010), *Pseudomonas delhiensis* (Prakash et *al.*, 2007) und einige Stämme von *Pseudomonas fluorescens* (z.B. Stamm Pf-5, Förster-Fromme et *al.*, 2006) beobachtet werden.

Während der ersten Schritte des Abbaus von Citronellol 2 und Geraniol 3a werden die Alkohole zu den entsprechenden Aldehyden (Citronellal 16 und Geranial 4a) und weiter zu den Säuren (Citronellsäure 17 und Geranylsäure 8) oxidiert (Seubert & Remberger, 1963, Abb. 2.7). Durch die hohe Ähnlichkeit, welche Citronellol 2 und Geraniol 3a zeigen, wurde zunächst angenommen, dass die Oxidation der Alkohole zu den Aldehyden und weiter zu den Säuren durch jeweils dieselben Enzyme katalysiert wird (Cantwell et *al.*, 1978). Durch

Höschle und Jendrossek (2005) konnte jedoch ein molybdänabhängiges Wachstum von *P. aeruginosa* auf Geraniol **3a** gezeigt werden, wohingegen dies bei *P. citronellolis* und *P. mendocina* nicht beobachtet werden konnte. Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Verwertung von Geraniol **3a** in diesen drei Organismen unterschiedlich ist. Da an dieser Stelle keine Molybdänabhängigkeit bei der Oxidation von Citronellol **2** in *P. aeruginosa* festgestellt werden konnte, wird durch die Arbeitsgruppe weiterhin angenommen, dass offensichtlich auch unterschiedliche Enzyme an den Oxidationsreaktionen von Citronellol **2** und Geraniol **3a** beteiligt sind (Höschle & Jendrossek, 2005). Nach der Oxidation zu den Säuren (**17**, **8**) erfolgt eine Aktivierung dieser zu den entsprechenden CoA-Estern, Citronellyl-CoA **18** und Geranyl-CoA **19**. Durch eine Dehydrogenase erfolgt die Umwandlung von Citronellyl-CoA **18** zu *cis*-Geranyl-CoA **19a** auf dessen Stufe sich der Abbau von Citronellol und Geraniol vereinigt (Abb. 2.7).



Abb. 2.7: "*upper atu pathway*": Einleitende Oxidations- und Aktivierungs-Reaktionen beim Abbau linearer Terpenoide im Atu-Stoffwechselweg nach Seubert & Fass (1964b; Förster-Fromme & Jendrossek, 2010b)

Ein Schlüsselenzym des Abbauweges ist die Geranyl-CoA Carboxylase (Seubert et *al.*, 1963, GCase). Dieses Enzym katalysiert den sich nun anschließenden Schritt, die Carboxylierung der β-Methylgruppe zu einer Acetatfunktion (Seubert & Remberger, 1963). Das durch diese Reaktion gebildete Isohexenyl-glutaconyl-CoA **20** wird durch die Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase (Seubert & Fass, 1964a) zu 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA **21** hydratisiert. Mit Hilfe der 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase (Seubert & Fass, 1964a) wird die durch die Geranyl-CoA-Carboxylase gebildete Acetatfunktion als freies Acetat **22** abgespalten und es entsteht 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA **23** (Seubert & Remberger, 1963). Die Reaktionen dieses Reaktionsabschnittes (*"lower atu pathway"*) sind in der Abbildung 2.8 schematisch dargestellt.



Abb. 2.8: *"lower atu pathway*": Zentrale Reaktionen des Atu-Stoffwechselweges und daran beteiligte Enzyme nach Seubert & Fass (1964b; Förster-Fromme & Jendrossek, 2010b)

Die Kohlenstoffkette des 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoAs **23** kann durch β -Oxidation weiter verkürzt werden. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist unklar, ob an diesen Schritten spezifische Enzyme des Terpenabbauweges oder die allgemeinen Enzyme des Fettstoffwechsels beteiligt sind. Mittels β -Oxidation wird das 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA **23** um eine Isopreneinheit verkürzt und es entsteht 3-Metylcrotonyl-CoA **29**, welches in den Leucinabbauweg eingeschleust und über diesen weiter verwertet wird (Abb. 2.9).



Abb. 2.9:Schematische Darstellung der Reaktionen an der Schnittstelle zwischen Atu- und Liu-Weg
Beide Wege vereinigen sich auf Stufe des 3-Methylcrotonyl-CoAs. (nach Seubert & Fass,
1964b; Förster-Fromme & Jendrossek, 2010b)

Die vom 3-Methylcrotonyl-CoA **29** weiterführenden Reaktionen sind in der Abb. 2.10 graphisch dargestellt. Analog zu den Reaktionen des Atu-Weges (*acyclic terpene utilisation*, Abb. 2.7 und 2.8) erfolgt auch im Liu-Weg (*leucine/isovalerate utilisation*) beim weiteren Abbau vom 3-Metylcrotonyl-CoA **29** zunächst die Carboxylierung der β -ständigen Methylgruppe. Die Reaktion wird an dieser Stelle durch die 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase (MCase) katalysiert. Dieses Enzym aus *P. citronellolis* besitzt eine hohe Spezifität zu ihrem Substrat 3-Methylcrotonyl-CoA **29** und ist nicht in der Lage, das Geranyl-

CoA **19** als Substrat umzusetzen (Seubert & Fass, 1964b; Hector & Fall, 1976; Fall & Hector, 1977; Fall, 1981). Die Doppelbindung des gebildeten 3-Methylglutaconyl-CoAs **30** wird durch die Methylglutaconyl-CoA Hydratase hydratisiert und 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA **31** erhalten, welches dann durch die Hydroxy-methyl-glutaryl-CoA Lyase zu Acetyl-CoA **24** und Acetoacetat **32** gespalten wird. Diese Produkte können anschließend in den Stoffwechsel der Organismen weiter umgesetzt werden.



Abb. 2.10: Abbau des 3-Methylcrotonyl-CoAs im weiteren Verlauf des Liu-Weges (*leucine/isovalerate utilisation*) nach Seubert & Fass (1964b; Förster-Fromme & Jendrossek, 2010b)

Die Gene für den Abbau von Citronellol und Geraniol in *P. citronellolis* und *P. aeruginosa* waren lange Zeit unbekannt. In vorausgegangenen Untersuchungen gelang die Identifizierung von zwei Gencluster, welche am Abbau von Citronellol beteiligt sind. Dabei handelt es sich um das *atu* (*acyclic terpene utilisation*) und das *liu* (*leucine/isovalerate utilisation*) Gencluster (Diaz-Perez et *al.*, 2004; Höschle et *al.*, 2005; Aguilar et *al.*, 2006; Förster-Fromme et *al.*, 2006). Durch verschiedenste Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass *atuC* und *atuF* die α - und β -Untereinheiten der Geranyl-CoA Carboxylase und *liuB* und *liuC* die α - und

 β -Untereinheiten der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase darstellen (Höschle et *al.*, 2005). Weiterhin konnten durch Datenbankvergleiche den entsprechenden Genen des Atu-Weges hypothetische Funktionen zugeordnet werden (Förster-Fromme et *al.*, 2006; Tab. 2.3). Es zeigte sich, dass AtuB und/oder AtuG die Citronellol-Dehydrogenase und/oder Citronellal-Dehydrogenase codieren können und dass AtuH die Citronellyl-CoA Synthetase darstellen müsste. Durch Förster-Fromme et *al.* (2008) konnte das Proteins AtuD bereits näher charakterisiert werden, wobei die Oxidation vom Citronellyl-CoA zum Geranyl-CoA durch dieses Protein experimentell bestätigt werden konnte. Da *atuC/atuF* die beiden Untereinheiten der GCase codieren bzw. AtuE hohe Ähnlichkeiten zu einer Enolyl-CoA Hydratase aufweist und somit die Isohexenylglutaconyl-CoA Hydratase darstellen müsste, bleibt lediglich die Funktion des *atuA*'s unbekannt.

PA Nr.	Gen-Name	Protein	putative Funktion entsprechend der Datensuche	putative Funktion im Terpenstoffwechsel
2886	atuA	AtuA	hypothetisches Protein	unbekannt
2887	atuB	AtuB	short- chain Dehydrogenase	Citronellol/Citronellal Dehydrogenase
2888	atuC	AtuC	Biotin-abhängige Carboxylase, β-UE	Geranyl-CoA Carboxylase, β-UE (Höschle et <i>al.</i> , 2005)
2889	atuD	AtuD	Acyl-CoA Dehydrogenase	Citronellyl-CoA Dehydrogenase (Förster-Fromme et <i>al.</i> , 2008)
2890	atuE	AtuE	Enolyl-CoA Hydratase/Isomerase	Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase
2891	atuF	AtuF	Biotin-abhängige Carboxylase, α-UE	Geranyl-CoA-Carboxylase, α-UE (biotinhaltig) (Höschle et <i>al.</i> , 2005)
2892	atuG	AtuG	short-chain Dehydrogenase	Citronellol/Citronellal Dehydrogenase
2893	atuH	AtuH	<i>very long-chain</i> Acyl-CoA Synthase	Citronellyl-CoA- Synthetase
2885	atuR	AtuR	regulatorisches Protein	Repressor des <i>atu</i> -Genclusters (Förster-Fromme & Jendrossek, 2010a)

 Tab. 2.3:
 Angenommene Funktionen der Gene des Atu-Weges (Förster-Fromme et al., 2006)

Das Protein AtuA (unbekanntes hypothetisches Protein) wurde spezifisch nur in Kulturen exprimiert, welche Citronellol bzw. Citronellat als C-Quelle enthielten (Förster-Fromme et
al., 2006; Förster-Fromme & Jendrossek, 2006). Durch Datenbankvergleiche konnte für dieses Protein keine signifikante Ähnlichkeit zu Proteinen bekannter Funktion festgestellt werden, sodass die Funktion unbekannt bleibt. Mit Hilfe einer Insertionsmutante (ins:*atuA*) konnte jedoch eine essentielle Funktion des AtuA Proteins im Atu-Weg festgestellt werden, da diese Mutante nicht mehr in der Lage war, Terpene zu verwerten. Polare Effekte konnten hier durch Verwendung eines pKnockout-G Plasmids ausgeschlossen werden, sodass der Phänotyp durch Insertion ins *atuA* Gen bedingt ist. Durch Rekonstitutionsanalysen mit *atuA* in *trans* konnte der Wildtypphänotyp wieder hergestellt werden (Förster-Fromme & Jendrossek, 2006). Nachdem den Genen des Atu-Weges aufgrund der Sequenzähnlichkeiten zu anderen Proteinen eine hypothetische Funktion zugeordnet werden konnte, bleibt lediglich die Funktion des AtuA Proteins unbekannt. Eine mögliche Funktion, die auf diesem Wege noch durch kein Protein besetzt werden konnte, ist die der 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase.

2.7. Ziele dieser Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die weiterführende Untersuchung des durch Seubert & Fass (1964b) postulierten Abbauweges von azyklischen Terpenoiden in P. citronellolis. In vorangegangenen Arbeiten von Höschle und Förster-Fromme konnten vor allem die Gene des Abbauweges in P. aeruginosa und P. citronellolis identifiziert werden (Förster-Fromme et al., 2006; Förster-Fromme & Jendrossek, 2006). Weiterhin war es möglich, die biochemischen Funktionen von einigen Genprodukten des Genclusters aus Tab. 2.3 näher zu charakterisieren. Dabei handelte es sich um AtuC/AtuF als die beiden Untereinheiten der Geranyl-CoA Carboxylase (Höschle et al., 2005, Förster-Fromme et al., 2006), AtuD als Citronellyl-CoA Dehydrogenase (Förster-Fromme et al., 2008) und AtuR als Repressor des atu-Genclusters (Förster-Fromme & Jendrossek, 2010a). Die Untersuchung von AtuC/AtuF in früheren Arbeiten beschränkte sich dabei auf die Klärung der Funktion als Carboxylase des Atu-Weges und somit auf den Nachweis der Expression der jeweiligen Gene bzw. die Synthese der Proteine in entsprechend induzierten Zellen (Western-Blot Analyse) und auf eine Aktivitätsbestimmung von Rohextrakten mit Geranyl- und Methylcrotonyl-CoA. Die Enzymabfolge des "lower atu pathways" ausgehend von der Geranyl-CoA Carboxylase (GCase) über die Hydratase und letzendlich die Funktion der Lyase (Abb. 2.11) wurden noch nicht näher untersucht. Somit ist in dieser Arbeit der Schwerpunkt auf diesen letzteren Teil des Atu-Weges gelegt.

Neben einer Charakterisierung der GCase, deren Aktivität schon in *P. aeruginosa* Rohextrakten in der Arbeit von Förster-Fromme et *al.* (2006) gezeigt werden konnte, sollte auch die durch Sequenzvergleiche postulierte Funktion von AtuE als Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase bestätigt werden. Weiterhin sollte versucht werden, die angenommene Rolle des AtuA Proteins als mögliche 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase in diesem Stoffwechsel zu klären. Da von der Arbeitsgruppe Campos Garcia (Aguilar et *al.*, 2006; Chavez-Aviles et *al.*, 2009; Chavez-Aviles et *al.*, 2010) angenommen wird, dass die Lyase des Liu-Weges LiuE auch die Funktion im Atu-Weg übernimmt, sollte diese Vermutung belegt bzw. wenn möglich Unterschiede in beiden Enzymen bzw. ihren Reaktionen gefunden werden.

Da die Substrate der Hydratase und der Lyase bzw. die entsprechenden Säuren als Vorstufe für die CoA-Synthese kommerziell nicht erhältich sind, sollten die entsprechend benötigten CoA-Ester somit über die Reaktion der GCase bereitgestellt werden. Erst bei erfolgreicher Reaktion dieses Enzyms, sollte es möglich sein, auch die nachfolgende Hydratase zu untersuchen. Das gleiche Problem ergab sich bei der Untersuchung der Lyase. Hierfür würden letztendlich eine aktive Carboxylase und Hydratase erforderlich sein.



Abb. 2.11: Darstellung der Reaktionsabfolge von der Geranyl-CoA Carboxylase bis zur Lyase Reaktion

Da wie zuvor erwähnt die Substrate der Enzyme, welche der Geranyl-CoA Carboxylase nachfolgen (Hydratase, Lyase), nicht käuflich zu erwerben sind, sollten diese zunächst über die natürliche Enzymabfolge in *P. aeruginosa / P. citronellolis* bereitgestellt werden. Dies setzt jedoch eine aktive Carboxylase und folgend auch eine aktive Hydratase voraus.

Um aber auch direkte Untersuchungen unabhängig von der Carboxylase durchführen zu können, wurde ein Teil der vorliegenden Arbeit am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart im Arbeitskreis von Prof. Dr. Plietker durchgeführt. Aus Sicht der Chemie ergaben sich dabei ebenfalls verschiedene Fragestellungen (Abb. 2.11).

Schon bei den Untersuchungen von Seubert et *al.* (1963) wurde festgestellt, dass die Geranyl-CoA Carboxylase aus *P. citronellolis* das *cis* und nicht das *trans* Isomer des Geranyl-CoAs als Substrat akzeptiert. Da die Geranylsäure als Edukt der CoA-Ester Synthese jedoch als Isomerengemisch vorliegt, wird auch der entsprechende Ester als Gemisch erhalten. Somit sollte hier zunächst eine Trennung der Doppelbindungsisomere erreicht werden, um dann folgend auch die entsprechenden CoA-Ester isomerenrein bereitzustellen.

Des Weiteren sollten die Vorstufen der Substrate für Hydratase (Isohexenyl-glutaconyl-CoA, **20**) und Lyase (3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA, **21**) dargestellt werden. Dabei würden bei der Vorstufe des Hydratase-Substrates wieder zwei Doppelbindungsisomere zur Verfügung stehen. Um zu überprüfen, ob beide Isomere oder lediglich eines der beiden als Substrat von der Hydratase akzeptiert wird, müssten auch diese im weiteren Verlauf getrennt dargestellt werden. Bei dem entsprechend hydroxylierten Produkt sind dagegen zwei Enantiomere möglich. Hieraus ergibt sich somit die Frage, ob das Enzym die Hydroxyfunktion stereospezifisch einfügt. Ferner müßten die resultierenden Enantiomere getrennt werden, wodurch somit eine Differenzierung der zwei Säurefunktionen erforderlich wäre, um eine Unterscheidung in Hinblick auf die spätere Position des CoenzymAs zu ermöglichen. Stünden die beiden Enantiomere des CoA-Esters **21** getrennt zur Verfügung, so könnte nicht nur die Rolle der Proteine AtuA und LiuE in diesem Schritt näher untersucht werden, sondern es wäre auch denkbar eine mögliche Enantiodifferenzierung durch das Protein mit der 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase Aktivität aufzuzeigen.

3. Material und Methoden

3.1. Organismen und Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Organismenstämme sind in Tabelle 3.1 aufgeführt. Die eingesetzten Plasmide sind in Tabelle 3.2 beschrieben.

Stamm	Genotyp	Herkunft/ Referenz
<i>Escherichia coli</i> JM109	recA1, endA1, gyrA96, thi, , hsdR17, supE44, relA1, λ , Δ (lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacI ⁹ lacZ Δ M15]	Yanisch-Perron et <i>al</i> ,. 1985
<i>Escherichia coli</i> Rosetta2 (DE3) pLysS RARE	F $ompT hsdS_B(r_B m_B) gal dcm$ (DE3) lacI Cam ^r p15a ori, tRNAgenes: proL, leuW, metT, argW, thrT, glyT, tyrU, thrU	Novagene, Darmstadt Novy et <i>al.</i> , 2001
Stamm	Phänotyp	Herkunft/ Referenz
Pseudomonas aeruginosa PAO1	G^+, C^+, Gs^+, Cs^+	ATCC 15692
Pseudomonas citronellolis	G^+, C^+, Gs^+, Cs^+	Seubert, 1960

Tab. 5.1: Obersicht über verwendete Organismer	Tab. 3.1:	Übersicht üb	er verwendete	Organismen
--	-----------	--------------	---------------	------------

Legende: G⁺: Geraniol, C⁺: Citronellol, Gs⁺: Geranylsäure, Cs⁺: Citronellsäure

Plasmid	Merkmale	Referenz
pJoe4036.1	Amp ^r , <i>rhaP</i> , <i>pT</i> 7, <i>lacPOZ</i> ', <i>rrnB</i> , <i>bla</i>	J. Altenbuchner
pJoe4036.1::atuD	<i>atuD</i> aus <i>P. aeruginosa</i> in pJoe4036.1 mit C-terminalen His- <i>Tag</i>	diese Arbeit
pJoe4036.1:: <i>atuCF</i> (pJoe4036.1::GCase)	<i>atuC und atuF</i> aus <i>P. aeruginosa</i> in Joe4036.1 mit C-terminalen His- <i>Tag</i>	diese Arbeit
pJoe4036.1::atuCDEF	<i>atuCDEF</i> aus <i>P. aeruginosa</i> in pJoe4036.1 mit C-terminalen His- <i>Tag</i>	diese Arbeit
pJoe4036.1::atuE	<i>atuE</i> aus <i>P. aeruginosa</i> in pJoe4036.1 mit C-terminalen His- <i>Tag</i>	diese Arbeit
pJoe4036.1::atuA	<i>atuA</i> aus <i>P. aeruginosa</i> in pJoe4036.1 mit C-terminalen His- <i>Tag</i>	diese Arbeit
pJoe4036.1:: <i>liuBCD</i> (pJoe4036.1::MCase)	<i>liuBCD</i> aus <i>P. aeruginosa</i> in pJoe4036.1 mit C-terminalen His- <i>Tag</i>	diese Arbeit

Tab. 3.2:	Übersicht über	verwendeten	Plasmic
Tab. 3.2:	Übersicht über	verwendeten	Plasmi

Plasmid	Merkmale	Referenz
pJoe4036.1:: <i>liuE</i>	<i>liuE</i> aus <i>P. aeruginosa</i> in pJoe4036.1 mit C-terminalen His- <i>Tag</i>	diese Arbeit
pET28a	<i>pT7</i> , Kan ^r , <i>ori pBR322</i> , <i>ori f1</i> , <i>lacI</i> , T7 Tag, N-term. $6 \times$ His, C-term. $6 \times$ His	Novagene, Darmstadt
pET28a::atuD	<i>atuD</i> aus <i>P. aeruginosa</i> in pET28a mit N-terminalen His- <i>Tag</i>	diese Arbeit, Förster-Fromme et <i>al.</i> , 2008
pET28a:: <i>liuA</i>	<i>liuA</i> aus <i>P. aeruginosa</i> in pet28a mit N-terminalen His- <i>Tag</i>	Förster-Fromme & Jendrossek, 2008
pCOLA Duet [™] -1	Kan ^r , <i>ColA ori, lacI, pT7</i> , mcs1 N-term. His- <i>Tag, pT7</i> , mcs2, C-term. Strep- <i>Tag</i>	Novagene, Darmstadt
pCOLA:Duet [™] -1:: <i>atuC</i>	<i>atuC</i> aus <i>P. aeruginosa</i> in pCOLA:Duet ^{M} -1, N-terminale His- <i>Tag</i> am <i>atuC</i> in der <i>mcs</i> 1	diese Arbeit
pCOLA:Duet [™] -1:: <i>atuCF</i>	atuC und atuF aus P. aeruginosa in pCOLA:Duet TM -1, N-terminale His-Tag am atuC in der $mcs1$, atuF ohne Tag in der $mcs2$	diese Arbeit
pCOLA:Duet [™] -1:: <i>atuF</i>	<i>atuF</i> aus <i>P. aeruginosa</i> in pCOLA:Duet TM -1, <i>atuF</i> ohne <i>Tag</i> in der <i>mcs</i> 2	diese Arbeit

FORSEIZUNG FADERE 5.2

mcs: multi cloning site

3.2. Kultivierung von Bakterien

Alle Geräte und hitzestabile Lösungen wurden vor dem Einsatz, wenn nicht anders angegeben, bei 121 °C für 20 min autoklaviert, hitzelabile Lösungen sterilfiltriert.

3.2.1. Vollmedium für E. coli

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde das LB-(Luria-Bertani) Medium nach Sambrook et *al.*, (1989) verwendet. Zur Selektion rekombinanter *E. coli*-Stämme wurden je nach Bedarf Antibiotika unter sterilen Bedingungen zugegeben (Kap.3.2.3.).

LB- Medium:	Trypton	10	g
	Hefeextrakt	5	g
	NaCl	10	g
	H ₂ O dest.	ad 1000	ml
LB- Agar:	LB- Medium		
	Agar	1,5 %	

3.2.2. Mineralmedium nach Schlegel et al. (1961)

Für die Kultivierung von *P. aeruginosa* und *P. citronellolis* wurde das Mineralmedium nach Schlegel et *al.* (1961) verwendet.

4,47	g
1,50	g
1,00	g
0,20	g
0,02	g
1,20	mg
0,10	ml
ad 1000	ml
	4,47 1,50 1,00 0,20 0,02 1,20 0,10 ad 1000

¹Spurenelementlösung SL6 (10000 ×) nach Pfennig (1974):

1,0	g
0,3	g
3,0	g
2,0	g
0,1	g
0,2	g
0,3	g
ad 1000	ml
	1,0 0,3 3,0 2,0 0,1 0,2 0,3 ad 1000

Von Magnesiumsulfat, Calciumchlorid und Eisenammoniumcitrat wurden 1000× konzentrierte Stammlösungen hergestellt. Die Zugabe der gewünschten C-Quelle und der Calciumchlorid-Stammlösung erfolgte steril nach dem Autoklavieren. Zur Herstellung von Mineralmedium-Nähragarplatten wurden Salz- und Agarlösung getrennt autoklaviert. Der Anteil an zugesetztem Agar betrug 1,5 % (w/v). Die beiden Lösungen wurden nach dem Autoklavieren vereinigt und in die entsprechenden Petrischalen gegossen. Für die Anzucht von *P. aeruginosa* und *P. citronellolis* auf Nähragarplatten wurden verschiedene C-Quellen verwendet. Die Konzentrationen dieser sind folgend aufgeführt:

Na-Succinat (Wasser-frei)	0,4	%
Na-Acetat	0,3	%
Glucose	0,5	%
Na-Citronellat	0,1	%
Na-Geranylat	0,1	%
N-Isovalerat	0,1	%

Kamen Geraniol oder Citronellol als C-Quelle in Betracht, so wurden vor Ausstrich der Bakterien je 20 µl des jeweiligen Alkohols an den Rand der Agarplatte gleichmäßig verteilt mit der Pipette eingespritzt. Die Platten wurden dann mit Parafilm luftdicht verschlossen und bei der entsprechenden Temperatur inkubiert.

3.2.3. Medienzusätze

Substanzen, die den Medien bzw. dem Agar nach dem Autoklavieren zugesetzt wurden, sind der Tabelle 3.3 zu entnehmen. Die Zugabe erfolgte nach Abkühlung der Medien auf mindestens 60 °C. Die Stammlösungen wurden jeweils steril filtriert, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Tab. 3.3: Medienzusä	tze	
Medienzusatz	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	100 mg/ml in dest. Wasser	100 µg/ml
Chlorampenicol	25 mg/ml in 70 % Ethanol	25 µg/ml
Kanamycin	20 mg/ml H ₂ O dest.	20 µg/ml
Tetracyclin	12,5 mg/ml in 50 % Ethanol	12,5 µg/ml
X-Gal	2 % in DMF	1 ml/ 500 ml Medium; 0,004 %
IPTG	1 M in dest. Wasser	100 µl/ 500 ml Medium; 0,2 mM
Rhamnose	20 % in dest. Wasser	0,2 %
Riboflavin	0,1 mg/ml in dest. Wasser	1 µg/ml
Biotin	0,1 mg/ml in dest. Wasser	1 μg/ml

3.2.4. Anzucht von E. coli-Stämmen

Für die Anzucht von *E. coli*-Stämmen (Tab. 3.1) wurde das LB-Medium in Kulturröhrchen bzw. Erlenmeyerkolben mit einer Einzelkolonie beimpft und aerob über Nacht bei 30 °C auf einem Rundschüttler (Infors HT AG, Schweiz) inkubiert. Bei *E. coli*-Stämmen mit eingebrachten Plasmiden (Tab. 3.2) erfolgte die Anzucht wie zuvor beschrieben, jedoch unter Zusatz der für die Anzucht bzw. für die Selektion nötigen Antibiotika. Die Kultivierung der *Pseudomonas*-Stämme erfolgte in Mineralmedium in Klettkolben bei 30 °C auf einem Inkubationsschüttler (Typ AI 16, Infors HT AG, Schweiz).

3.2.5. Messung des Bakterienwachstums

Das Wachstum einer Bakterienkultur wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) photometrisch bei 600 nm gegen unbeimpftes Nährmedium bestimmt. Die Messung erfolgte in Plastikküvetten (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) mit einer Schichtdicke von 1 cm am Cary 100 Bio UV-Visible Spektrophotometer (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt) bis zu einer OD von 0,5. Wurde dieser Messwert überschritten, so erfolgte eine Verdünnung des Messansatzes mit Nährmedium. Wurden Kulturen in Klettkolben angezogen, so erfolgte die Trübungsmessung am Klettphotometer (Klett-Summerson Photoelectric Colorimeter, Model 800-3, Klett MFG. Co., Inc. NY, USA) bei einer Lampenintensität von 85 %.

3.2.6. Zellernte

Eine Zellernte im kleinen Maßstab (bis 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße) erfolgte in der Tischzentrifuge (Typ 5417C, Rotor 45-30-11 Eppendorf AG, Hamburg) bei 14000 rpm. Bakterienkulturen bis zu 100 ml wurden durch Zentrifugation bei 5100 rpm (Sigma Zentrifuge Typ 4K15, Rotor 402/D, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode) geerntet. Für größere Ansätze kam dagegen die Avanti[™] J-25 Zentrifuge und der JA-10 Rotor (beides Beckman Coulter GmbH, Krefeld) zum Einsatz.

3.2.7. Stammhaltung

Die langfristige Lagerung von *E. coli*-Stämmen erfolgte als Glycerinkultur. Zur Herstellung dieser wurde eine Kultur in LB-Medium über Nacht bei 30 oder 37 °C unter Schütteln angezogen. 0,9 ml dieser Übernachtkultur wurden entnommen, mit 0,9 ml sterilem 87 %igem Glycerin versetzt und bei -80 °C in Stammhaltungsröhrchen eingefroren. Eine kurzfristige Lagerung bis zu 4 Wochen war auf Nähragarplatten bei 4 °C möglich.

P. aeruginosa und *P. citronellolis* wurden mittels gefriergetrockneter Filterplättchen konserviert und aufbewahrt. Zellmaterial aus einer Übernachtkultur wurde hierfür auf eine Succinat-Agarplatte ausplattiert und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Das gewachsene Zellmaterial wurde am nächsten Tag mit 1 ml einer 10 % (w/v) Magermilchpulver und 5% (w/v) meso-Inosit-Lösung in bidestillierten Wasser abgeschwemmt. Die Suspension konnte folgend mit ca. 15 sterilen und trockenen Filterplättchen (Antibiotika-Testplättchen von Schleicher und Schuell) aufgenommen werden. Nach einer sterilen Lagerung dieser bei -20 °C für 2-3 Stunden wurden die Filterplättchen dann für 24 Stunden im Lyophilisator (Christ ALPHA I-5, Osterode) gefriergetrocknet. Im Anschluss wurden die Filterplättchen in Stammhaltungsröhrchen mit Kieselgel und Glaswolle überführt und bei -80 °C gelagert. Die Reaktivierung eines so gelagerten Stammes erfolgte durch Zugabe von 1-2 Filterplättchen zu 10 ml entsprechenden Mediums und folgend einer Inkubation bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler über Nacht.

3.3. Isolierung von Nukleinsäuren

3.3.1. Isolierung von chromosomaler DNA aus P. aeruginosa

Die Isolierung von chromosomaler DNA aus *P. aeruginosa* erfolgte aus 10 ml einer Übernachtkultur. Diese wurde für 15 min bei 5100 rpm und 4 °C zentrifugiert, das Zellmaterial dann in 6 ml Phosphatpuffer (10 mM Di-Natriumhydrogenphosphat-Puffer, pH 6,8) resuspendiert und anschließend erneut für 15 min zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde folgend in 0,85 ml eiskalter Saccharose-Tris-Lösung (25 % Saccharose; 10 mM Tris/HCl, pH 8,0) resuspendiert. Dann erfolgte die Zugabe von 100 µl Lysozymlösung (10 mg/ml) und eine 15-minütige Inkubation bei 37 °C. Nach dieser Inkubationszeit wurden dem Ansatz 1,25 ml einer eiskalten Saccharose-Tris-Lösung, 100 µl Proteinase K-Lösung (2,5 mg/ml) und 1,25 ml SDS-Lösung (1,5 % SDS in TE-Puffer) zugesetzt. Es schloss sich eine erneute Inkubation bei 37 °C für 3 Stunden an. Folgend wurde dem Gemisch 0,94 ml einer 5 M Natriumperchlorat Lösung zugegeben und vorsichtig gemischt. Es folgte die Zugabe von 2,5 ml eines Phenol:Chloroform Gemisches (1:1) und wiederholt vorsichtiges Mischen. Dann wurde erneut für 30 min zentrifugiert und der wässrige Überstand vorsichtig abgenommen. Die Phenol/Chloroform Extraktion der wässrigen Phase wurde so lange wiederholt, bis alles Protein fest an der Interphase "gebunden" war. Die wässrige Phase wurde dann abgenommen, mit 50 μl RNase-Lösung (5 mg/ml) versetzt und 30 min bei 37 °C inkubiert. Daran schloss sich eine DNA-Fällung an. Hierfür erfolgte die Zugabe von 0,7 Vol. Isopropanol zum Ansatz und ein kurzes, vorsichtige Mischen. Der Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann 30 min zentrifugiert. Es folgte das Waschen des Pellets mit 70 %igem Ethanol und eine Zentrifugation für 5 min. Die DNA wurde folgend getrocknet und konnte dann in dest. Wasser bzw. TE-Puffer (10 mM Tris/ HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) gelöst werden.

3.3.2. Isolierung von Plasmid-DNA (Sambrook et al., 1989)

Die Isolierung der verwendeten Plasmide beruht auf dem Prinzip der alkalischen Lyse in Gegenwart von SDS. Die Methode kam für die Analyse von Transformanten zur Anwendung, wobei die Anwesenheit der entsprechenden Plasmide und die einklonierten Fragmente zu überprüfen waren.

Es wurden 3-6 ml einer entsprechenden Übernachtkultur etappenweise bei 14000 rpm für 1 min zentrifugiert (Tischzentrifuge 5417C, Rotor 45-30-11 Eppendorf AG, Hamburg). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 250 µl Lösung 1 (25 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 mM Glukose; 10 mM EDTA) vollständig resuspendiert und folgend 5 µl RNase-Lösung (5 mg/ml) zugesetzt. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 250 µl frisch hergestellter Lösung 2 (0,2 M NaOH; 1 % (w/v) SDS) und das vorsichtige Invertieren des Reaktionsgefäßes. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden 350 µl eiskalte Lösung 3 (3 M K-Acetat; 2 M Essigsäure, pH 5,5) zugesetzt, der Ansatz vorsichtig gemischt und für 3-5 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 14000 rpm. Im Anschluss daran wurden 500 µl des Überstandes in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl eines Phenol:Chloroform Gemisches (1:1) versehen. Der Ansatz wurde auf dem Vortexgerät (Vortex-Shaker Typ REAX 2000, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach) gemischt und folgend für 2 min zentrifugiert (12000 rpm), erneut 500 µl des Überstandes entnommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von 2,5 Volumenanteilen 96 %igem Ethanol, Mischen und einer Inkubation für zwei Minuten bei Raumtemperatur (RT) wurde die doppelsträngige DNA präzipitiert. Daran schloss sich eine Zentrifugation bei 12000 rpm für 5 min an. Der Überstand wurde vollständig entfernt, das Pellet mit 1 ml 70 %igen Ethanol gewaschen und nach dem erneuten Entfernen des Überstandes getrocknet, bevor es in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) oder dest. Wasser aufgenommen und bei -20 °C gelagert wurde.

3.3.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli mittels Spin-Präparation

Wurden z.B. für Sequenzierung, PCR oder Transformation sehr saubere Mengen an Plasmid-DNA aus *E. coli* benötigt, so erfolgte die Isolierung mit dem Roche *High Pure Plasmid Isolation* Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bzw. mit dem *NucleoSpin® Plasmid Präp* Kit von Macherey-Nagel (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren).

Für die Isolierung der DNA wurden 3-6 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie des entsprechenden Klons angeimpft und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Die Zellkultur wurde etappenweise in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und in der Tischzentrifuge (14000 rpm, 1 min) abzentrifugiert. Die Isolierung des Plasmids aus dem so erhaltenen Zellmaterial wurde dann entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

3.4. Standardmethoden für das Arbeiten mit Nukleinsäuren

Die verwendeten Medien, Lösungen und Geräte wurden bei 121 °C für 20 min autoklaviert. Nicht autoklavierbare Geräte wurden mit 70 % igem (v/v) Ethanol behandelt oder abgeflammt, hitzelabile Lösungen sterilfiltriert.

3.4.1. Fällung von Nukleinsäuren

Die Fällung von Nukleinsäuren diente zu ihrer weiteren Reinigung und Aufkonzentrierung. Für die Ethanolfällung wurden der zu fällenden Lösung 0,1 Vol. einer 3 M Na-Acetat-Lösung (pH 5,2) und 2,5 bis 3 Vol. 96 %iges Ethanol zugesetzt. Nach einer Inkubation bei -80 °C für 1 h oder bei -20 °C über Nacht wurde die Probe zentrifugiert (14000 rpm, 20 min). Das erhaltene Pellet wurde mit 1 ml 70 %igen eiskaltem Ethanol gewaschen, erneut für 5 min zentrifugiert (14000 rpm) und nach dem Trocknen in sterilem dest. Wasser aufgenommen. Bei der Isopropanolfällung wurden der Lösung anstelle des Ethanols 0,7 Vol. Isopropanol zugesetzt. An dieser Stelle war keine Inkubation erforderlich. Ansonsten wurde wie oben beschrieben verfahren.

3.4.2. Standard Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische und präparative Auftrennung von DNA Fragmenten erfolgte in 0,8-1,5 %igen Agarosegelen in TBE-Puffer (50 mM Tris, 50mM Borsäure, 2,5 mM EDTA). Die Agarose (UltraPureTMAgarose, Invitrogen GmbH, Darmstadt) wurde in 1× TBE-Puffer in der Mikrowelle durch Kochen vollständig gelöst und nach kurzer Abkühlung in die horizontale Gelkammer gegossen. Die Kammer wurde nach dem völligen Erstarren des Gels mit 1× TBE-Puffer gefüllt. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 1× Ladepuffer (0,25 % (w/v) Xylencyanol, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 50 % (v/v) Glycerin, 0,25 mM (w/v) EDTA, pH 8) versetzt. Die Auftrennung erfolgte bei 140 V. Anschließend wurde das Gel 15-20 min im Ethidiumbromidbad (10 µg/ml in Wasser) inkubiert, mit Wasser gespült und mit Hilfe eines Video-Dokumentationssystems ausgewertet und fotografiert.

3.4.3. DNA-Größenbestimmung

Zur Bestimmung der Größe der aufzutrennenden DNA-Fragmente wurde zusätzlich in jedem Agarosegel ein DNA-Größenstandard aufgetragen. In dieser Arbeit wurden kommerziell erhältliche DNA-Marker der Firma MBI Fermentas (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) verwendet.

Fragmentgrößen in bp:

Gene Ruler[™] DNA Ladder Mix

10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100

Gene Ruler[™] 50 bp DNA L*adder* 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 250, 200, 150, 100, 50 3.4.4. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für Klonierungsexperimente wurden DNA-Fragmente nach Auftrennung in Agarosegelen mit Hilfe des *Perfectprep[®] Gel Cleanup* Kits (Eppendorf AG, Hamburg) oder des *NucleoSpin[®] Extract II* Kit von Macherey-Nagel (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) isoliert. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben der Hersteller.

Die DNA wurde zunächst in einem 1 %igem Agarosegel (Kap.3.4.2.) aufgetrennt, anschließend mit Hilfe eines der oben genannten Systeme aus dem Gel eluiert, aufgereinigt und in 30 µl dest. Wasser aufgenommen.

3.4.5. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA erfolgte für 2-3 h (analytischer Verdau von Plasmid-DNA) bzw. über Nacht (Verdau von Vektoren, PCR-Fragmenten) mit 1-2 U Restriktionsendonuklease. Der Verdau wurde bei der für das eingesetzte Enzym spezifischen Temperatur und mit dem entsprechend angegebenen Puffer (siehe Herstellerangaben) durchgeführt. Nach erfolgter Reaktion wurden die Restriktionsendonukleasen, sofern möglich mittels Hitzedenaturierung (20 min, 65 °C) inaktiviert. War dies nicht möglich, so erfolgte eine Reinigung der Ansätze über Gelelution (Kap.3.4.4.).

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot) und New England Biolabs (NEB GmbH, Frankfurt/Main) bezogen.

An vereinzelter Stelle wurde in Klonierungsexperimenten eine *Bam*HI-Schnittstelle am Ende eines Genfragmentes mittels PCR eingeführt, obwohl auch in der amplifizierten DNA-Gensequenz selbst diese Erkennungssequenz zu finden war. Damit ergab sich das Problem, das lediglich DNA Fragmente, bei welchen spezifisch nur die äußere Erkennungssequenz durch das Enzym geschnitten wurde, weiter verwendet werden konnten. Um diese gewünschten Restriktionsprodukte zu erhalten, wurde ein partieller *Bam*HI Verdau notwendig. Hierfür wurde zunächst ein Reaktionsmix aus 16 μ l H₂O dest, 2 μ l *Bam*HI (NEB), 2 μ l Puffer 3 (NEB) und 0,2 μ l BSA angesetzt. Zu jeweils 15 μ l bereits mit *Nde*I verdauter und aufgereinigter DNA wurden nun unterschiedliche Mengen und somit Konzentrationen an *BamH*I Mix zugegeben (5 μ l-0,25 μ l Mix). Die Ansätze wurden bei 37 °C für 30 min inkubiert und im Anschluss sofort auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt. Die gewünschte Bande entsprechender Größe wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und über den *Perfectprep[®] Gel Cleanup* Kit (Eppendorf AG, Hamburg, Kap.3.4.4.) aufgereinigt.

3.4.6. Dephosphorylierung von DNA

Zur Vermeidung der Selbstligation linearisierter Vektor-DNA erfolgte nach Abschluss der DNA-Spaltung eine Dephosphorylierung mit alkalischer Phosphatase (Antarctic Phospathase, NEB GmbH, Frankfurt/Main). Dazu wurde dem Restriktionsansatz 1 U Enzym zugegeben und anschließend 2 h bei 37 °C inkubiert. Danach erfolgte die Inaktivierung des Enzyms durch eine 5-minütige Inkubation bei 65 °C.

3.4.7. Ligation

Ligationen von Vektorplasmiden mit DNA-Fragmenten erfolgten im 20 µl Ansatz mit 1 U T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon-Roth oder NEB GmbH, Frankfurt/Main). Die Ligationsreaktion erfolgte bei Raumtemperatur für 2 h bzw. bei 16 °C über Nacht. Alternativ kam an vereinzelter Stelle der *Rapid DNA Ligation* Kit der Firma Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) zum Einsatz. Hier wurde entsprechend den Herstellerangaben verfahren.

3.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Der Einsatz thermostabiler DNA-Polymerasen in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten, die z.B. für Klonierungen eingesetzt werden können. Außerdem kann die PCR genutzt werden, um DNA-Fragmente und/oder rekombinante Plasmide nachzuweisen. Mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden und der DNA-Polymerase können spezifische DNA-Abschnitte exponentiell amplifiziert werden (Innis et *al.*, 1990). Der Erfolg der PCR-Reaktionen wurde im Anschluss im Agarosegel (Kap.3.4.2.) überprüft.

Die PCR-Reaktion wurde in einem Volumen von 50 µl mit der *Pwo*-Polymerase (Genaxxon, BioScience GmbH, Ulm) in einem geschlossenen PCR-Gerät (TGradient Thermoycler, Biometra GmbH, Göttingen) durchgeführt. Die Oligonukleotidprimer (Tab. 3.4) wurden von den Firmen Eurofins MWG GmbH (Martinsried) bzw. Operon (Operon molecules for life, Köln; aktuell jetzt Eurofins MWG Operon, Ebersberg) synthetisiert und bezogen. Durch den geschlossenen Thermocycler war ein Überschichten des Ansatzes mit Mineralöl unnötig.

3.5.1. PCR mit Pwo-bzw Pfu- DNA Polymerase

Aufgrund der *proof-reading* Funktion der *Pwo-* bzw der *Pfu-*Polymerase wurden diese beiden Enzyme zur Herstellung von PCR-Fragmenten, die zur Klonierung in Expressionsvektoren dienen sollten, verwendet.

Ansatz:	<i>"upper"</i> -Primer (20	μΜ)	2,5	μl	
	"lower"-Primer (20	μΜ)	2,5	μl	
	Template DNA		2,0	μl	
	10× Puffer		5,0	μl	
	dNTP's (10 mM)		1,0	μl	
	DMSO		3,0	μl	
	H ₂ O dest.		ad 50	μl	
			+ 0,5	µl <i>Pwo-</i> DNA	Polymerase
Programm:	Denaturierung	95 °C		2 min	
	Denaturierung	95 °C		30 sec +	
	Anlagerung	40 bis 60	$^{\circ}C^{*}$	30 sec	30 Zyklen
	"Extension"	72 °C		1-3 min [#] ——	
		72 °C		7 min	
		4 °C			

^{*}Temperatur richtete sich nach dem verwendeten Primerpaar

[#]Länge des *Extensions*-Schrittes richtet sich nach Fragmentgröße und verwendeter Polymerase

3.5.2. PCR mit *Prime*STAR[™] HS DNA Polymerase (Lonza Cologne GmbH, Köln)

Die *PrimeStar*[™]HS DNA Polymerase stellt eine synthetische Polymerase dar, welche auf Effizienz und Spezifität optimiert wurde. Aufgrund dieser Eigenschaften und ihrer *proofreading*-Funktion war es möglich, sehr lange und schwierig zu amplifizierende Genfragmente zu vervielfältigen.

Ansatz:	"upper"-Primer (20 µM)		2,5	μl	
	"lower"-Primer (20 µM)		2,5	μl	
	Template DNA		2,0	μl	
	5× Puffer		10,0	μl	
	dNTP's (2,5 mM)		4,0	μl	
	DMSO		3,0	μl	
	DNA Polymerase (2,	,5U/ μl)	0,5	μl	
	H ₂ O dest.		ad 50	μl	
Programm:	Denaturierung	98 °C		2 min	
	Denaturierung	98 °C		10 sec 🔶	7
	Anlagerung	55 oder	60 °C	5 oder 15 sec	30Zyklen
	"Extension"	72 °C		1-3 min [#] ——	
		72 °C		7 min	
		4 °C			

[#]Länge des *Extensions*-Schrittes richtet sich nach Fragmentgröße

3.5.3. PCR mit Taq-DNA Polymerase

Zur Analyse von rekombinanten DNA-Konstrukten wurde die *Taq*-DNA Polymerase von Genaxxon (Genaxxon BioScience GmbH, Ulm) verwendet, da an dieser Stelle keine *proofreading*-Funktion erforderlich war. Die Synthesegeschwindigkeit wird vom Hersteller mit ca. 2 kb pro Minute veranschlagt.

Ansatz:	" <i>upper</i> "-Primer (20 μM)	2,5	μl
	"lower"-Primer (20 µM)	2,5	μl
	Template DNA	2,0	μl
	10× Puffer S	2,5	μl
	10× Puffer E	2,5	μl
	dNTP's (10 mM)	1,0	μl
	DMSO	3,0	μl
	H ₂ O dest.	ad 50	μl
		+ 0,2	µl Taq- DNA-Polymerase

Programm:	Denaturierung	95 °C	2 min	
	Denaturierung	95 °C	30 sec •	1
	Anlagerung	40 bis 60 °C *	30 sec	30Zyklen
	"Extension"	72 °C	1-3 min [#] ——	
		72 °C	5 min	
		4 °C		

^{*}Temperatur richtete sich nach dem verwendeten Primerpaar

[#]Länge des *Extensions*-Schrittes richtet sich nach Fragmentgröße und verwendeter Polymerase

3.5.4. Oligonukleotidprimer

Alle hier aufgeführten und verwendeten Primersequenzen (Tab. 3.4) wurden mit Hilfe des Programms *Primer Select* von DNA-Star ausgewählt. Diesem Programm wurden auch die nötigen Schmelztemperaturen entnommen. Die erforderlichen Gensequenzen des Stammes *P. aeruginosa* PAOI zum Ableiten der Primersequenzen wurden von der Datenbank www.pseudomonas.com erhalten. Die optimalen Anlagerungstemperaturen wurden so gewählt, dass sie ca. 5 °C unter der ermittelten Schmelztemperatur T_m der eingesetzten Primer lag. Bei Problemen, d.h. dem Fehlen eines PCR Produktes, erfolgte das Überprüfen der Temperatur durch eine PCR-Reaktion mit einem eingestellten Temperaturgradienten. Die Temperatur wurde dann gegebenenfalls angepasst.

In Tabelle 3.4 sind die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotidprimer aufgelistet. Sie wurden durch die Firma Eurofins MWG GmbH (Martinsried) bzw. Operon (Operon molecules for life, Köln; aktuell jetzt Eurofins MWG Operon, Ebersberg) synthetisiert und bezogen.

Primer	Charakterisierung	Sequenz in 5'-3' Richtung
pJOEf	Primer für die Kontrolle von Klonierungsprodukten	GAG AAG GTC GCG AAT TCA GGC
pJOEr	Sequenzierprimer aus dem Plasmid pJoe heraus in das Gen	TCT GTT TTA TCA GAC CGC TTC TGC
t7	Sequenzierprimer aus dem Plasmid pJoe heraus in das Gen	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

Tab. 3.4:ZurKlonierungundSequenzierungverwendeteOligonukleotide.DieeingefügtenSchnittstellen der Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

Primer	Charakterisierung	Sequenz in 5´-3´ Richtung
atuE-upper	Amplifizierung des <i>atuE</i> -Genes aus <i>P. aeruginosa</i>	GGA ATT C <u>CA TAT G</u> AG CCT GCC GCA TTG CGA GAC
atuE-lower	Amplifizierung des <i>atuE</i> -Genes aus <i>P. aeruginosa</i>	CG <u>G GAT CC</u> C TGG GCC CAG ACC GGC TTG
PA 2889 Start	Amplifizierung des <i>atuD</i> -Genes aus <i>P. aeruginosa</i>	GGA ATT C <u>CA TAT G</u> AT CTT CAC CCA GGA ACA CGA GG
atuD-lowerHis	Amplifizierung des <i>atuD</i> -Genes aus <i>P. aeruginosa</i>	CG <u>G GAT CC</u> G CCT TTC TTC TTG CCC GGC AG
atuA-upper	Amplifizierung des <i>atuA</i> -Genes aus <i>P. aeruginosa</i>	GGA ATT C <u>CA TAT G</u> CA AAA GAC CGT ACG CAT CGG CTG C
atuA-lower	Amplifizierung des <i>atuA</i> -Genes aus <i>P. aeruginosa</i>	CG <u>G GAT CC</u> T CTG CCC TGC GTT TCC AGC GC
atuA-Ls1	Sequenzierprimer für das Konstrukt pJoe4036.1:: <i>atuA´</i>	GGC CTG GGA CGA CTA CGA C
atuC_ExpGCase_upper	Amplifizierung des <i>atuC</i> -Genes aus <i>P. aeruginosa</i> für die Herstellung des Konstruktes pJoe4036.1:: <i>atuCF</i>	GGA ATT C <u>CA TAT G</u> CC CGC GAT CCA GTC GGA ACT C
<i>atuC</i> _ExpGCase_lower	Amplifizierung des <i>atuC</i> -Genes aus <i>P. aeruginosa</i> für die Herstellung des Konstruktes pJoe4036.1:: <i>atuCF</i>	GC <u>T CTA GA</u> T CGC CGG CTC GCC TGT TTC
atuF_ExpGCase_upper	Amplifizierung des <i>atuF</i> -Genes aus <i>P. aeruginosa</i> für die Herstellung des Konstruktes pJoe4036.1:: <i>atuCF</i>	GC <u>T CTA GA</u> G CCA CGA CCG CGA AAC AGG G
atuF_ExpGCase_lower	Amplifizierung des <i>atuF</i> -Genes aus <i>P. aeruginosa</i> für die Herstellung des Konstruktes pJoe4036.1:: <i>atuCF</i>	CG <u>G GAT CC</u> G GCG TCG GCT TCC ACC TCG AC
GCase_Ls1	Sequenzierprimer für die Konstrukte pJoe4036.1:: <i>atuCF</i> und pJoe4036.1:: <i>atuCDEF</i>	ACC TGG CGG AAA ACG ACG
GCase_Ls2	Sequenzierprimer für das Konstrukt pJoe4036.1:: <i>atuCF</i>	GCC ACG ACC GCG AAA CAG
GCase_Ls3	Sequenzierprimer für das Konstrukt pJoe4036.1:: <i>atuCDEF</i>	GGG GTC GCG AGG TTC TGA
GCase_Ls4	Sequenzierprimer für das Konstrukt pJoe4036.1:: <i>atuCDEF</i>	TCC AGG AAG AAC GGC TGT T

Primer	Charakterisierung	Sequenz in 5´-3´ Richtung
GCase_Ls5	Sequenzierprimer für das Konstrukt pJoe4036.1:: <i>atuCDEF</i>	ACC AGC CTC GGC ATT CTC C
GCase_Gs1	Sequenzierprimer für die Konstrukte pJoe4036.1:: <i>atuCF</i> und pJoe4036.1:: <i>atuCDEF</i>	GGC GAG GAA CCG CTG GTT
GCase_Gs1_2b	Sequenzierprimer für das Konstrukt pJoe4036.1:: <i>atuCDEF</i>	GCG CCG GCC TGG TAG AG
GCase_Gs3	Sequenzierprimer für das Konstrukt pJoe4036.1:: <i>atuCDEF</i>	GGG CTT CCT CGA TGA CCT TC
ExpMCase_upper	Amplifizierung der Gene <i>liuBCD</i> aus <i>P. aeruginosa</i> für die Herstellung des Konstruktes pJoe4036.1:: <i>liuBCD</i>	GGA ATT C <u>CA TAT G</u> GC CAT CCT GCA CAC CCA GAT CAA TC
ExpMCase_lower	Amplifizierung der Gene <i>liuBCD</i> aus <i>P. aeruginosa</i> für die Herstellung des Konstruktes pJoe4036.1:: <i>liuBCD</i>	CG <u>G GAT CC</u> G GCC TGG TTC TCG TCC AGC TCC
MCase_Ls1	Sequenzierprimer für das Konstrukt pJoe4036.1:: <i>liuBCD</i>	GTC AGC GCC GAG GAA CTT G
MCase_Ls2	Sequenzierprimer für das Konstrukt pJoe4036.1:: <i>liuBCD</i>	GCC CTC AAC GCC CCC A
MCase_Gs1	Sequenzierprimer für das Konstrukt pJoe4036.1:: <i>liuBCD</i>	GGC TTC CTC GCG GGT TTC
MCase_Gs2	Sequenzierprimer für das Konstrukt pJoe4036.1:: <i>liuBCD</i>	CCA CCT TCA TGC CCT TGC
His_atuC-upper	Amplifizierung des <i>atuC</i> Gens aus <i>P. aeruginosa</i> für die Herstellung des Konstruktes pCOLA Duet TM -1:: <i>atuC</i>	G <u>GA ATT C</u> AC CCG CGA TCC AGT CGG A
atuC_HindIII_low	Amplifizierung des <i>atuC</i> Gens aus <i>P. aeruginosa</i> für die Herstellung des Konstruktes pCOLA Duet [™] -1:: <i>atuC</i>	CCC <u>AAG CTT</u> TCA GAA CCT CGC GAC CCC
atuF_NdeI_upper	Amplifizierung des <i>atuF</i> Gens aus <i>P. aeruginosa</i> für die Herstellung des Konstruktes pCOLA Duet [™] -1:: <i>atuF</i>	GGA ATT C <u>CA TAT G</u> CC CAG CTT CAA CAA GAT CCT CC
<i>atuF_Fse</i> I_lower	Amplifizierung des <i>atuF</i> Gens aus <i>P. aeruginosa</i> für die Herstellung des Konstruktes pCOLA Duet TM -1:: <i>atuF</i>	GGC CGG CCT CAG GCG TCG GCT TCC A

Primer	Charakterisierung	Sequenz in 5´-3´ Richtung
ACYC DuetUP1	Sequenzierprimer $mcs1$ vom pCOLA Duet TM -1	GGA TCT CGA CGC TCT CCC T
DuetDOWN1	Sequenzierprimer <i>mcs</i> 1 vom pCOLA Duet [™] -1	GAT TAT GCG GCC GTG TAC AA
DuetUp2	Sequenzierprimer <i>mcs</i> 2 vom pCOLA Duet [™] -1	TTG TAC ACG GCC GCA TAA TC
T7 Terminator	Sequenzierprimer <i>mcs</i> 2 vom pCOLA Duet [™] -1	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G
<i>liuE</i> -upper	Amplifizierung des <i>liuE</i> Gens aus <i>P. aeruginosa</i> zur Herstellung des Konstruktes pJoe4036.1:: <i>liuE</i>	GGA ATT C <u>CA TAT G</u> AA CCT GCC GAA GAA GGT CCG
<i>liuE-BamH</i> I-lower	Amplifizierung des <i>liuE</i> Gens aus <i>P. aeruginosa</i> zur Herstellung des Konstruktes pJoe4036.1:: <i>liuE</i>	CG <u>G GAT CC</u> G GCC TTG GCC AGC AAC GC

Fortsetzung Tabelle 3.4

mcs: multi cloning site

3.5.5. Kolonie-PCR

Für die Untersuchung von scheinbar positiven Klonen mittels PCR wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierfür wurde Zellmaterial direkt von der Nähragarplatte abgenommen und in 50 µl dest. Wasser resuspendiert. Die Ansätze wurden für mindestens 30 min bei -20 °C gelagert. Als *template* DNA wurde Material der aufgetauten Zellsuspension verwendet. Der Ansatz der PCR entsprach ansonsten dem oben aufgeführten Ansatz (Kap.3.5.3.).

3.5.6. Reinigung von DNA-Fragmenten aus PCR-Reaktionen

PCR-Produkte, die für Klonierungszwecke weiter verwendet werden sollten, wurden zur Abtrennung von Primern und Nukleotiden mit dem *High Pure PCR Product Purification* Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) aufgereinigt. Dabei wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren. Für eine Aufreinigung von DNA-Fragmenten wurde alternativ auch der *Perfectprep[®] Gel Cleanup* Kit (Eppendorf AG, Hamburg) verwendet (Kap.3.4.4.).

3.6. Herstellung und Selektion rekombinanter E. coli-Klone

3.6.1. Herstellung von lagerungsfähigen kompetenten Zellen

Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 100 ml selektives LB-Medium 1 %ig mit einer über Nacht gewachsenen Kultur beimpft und bei 30 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,4 inkubiert. Die Zellen wurden für 10 min auf Eis gekühlt und anschließend 10 min bei 3000 rpm und 4 °C in sterilen 50 ml Reaktionsgefäßen (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) zentrifugiert. Es folgte das Resuspendieren des Zellpellets in 15 ml steriler, eiskalter 100 mM CaCl₂-Lösung. Nach einer Inkubation der Zellen auf Eis für mindestens 1 h wurde erneut zentrifugiert (10 min, 3000 rpm, 4 °C) und das erhaltene Pellet in 2 ml steriler, eiskalter CaCl₂-Lösung (100 mM) mit 15 % Glycerin resuspendiert. Der Ansatz wurde für mindestens 2 h auf Eis inkubiert, folgend á 200 µl aliquotiert und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die kompetenten Zellen wurden bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.6.2. Herstellung von kompetenten Zellen nach Chung et al. (1989)

Für die schnelle Herstellung von frischen kompetenten Zellen zur sofortigen Verwendung wurden 20 ml LB-Medium 1 %ig mit Material einer Vorkultur oder von einer frischen Agarplatte angeimpft. Die Kultur wurde für 1-2 Stunden bei 37 °C unter Schütteln inkubiert, bis eine leichte Trübung (OD_{600} 0,3-0,4) zu beobachten war. Es folgte die Ernte der Zellen durch Zentrifugation in der Sigma Zentrifuge für 10 min bei 4500 rpm und 4 °C in einem sterilen 50 ml Reaktionsgefäß (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht). Das Zellpellet wurde in 1 ml sterilem, kaltem TSS Medium (89 ml LB-Medium; 10 g PEG 6000; 4,72 ml DMSO; 2,5 ml 2 M MgCl₂; sterilfiltriert (0,2 µm); Lagerung bei 4 °C) resuspendiert, 2 min auf höchster Stufe intensiv gevortext (Vortex-Shaker Typ REAX 2000, Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach), für mindestens 1 min auf Eis inkubiert und anschließend aliquotiert (á 200 µl). Die Zellen standen nun für die Transformation zur Verfügung.

3.6.3. Transformation

Für die CaCl₂-vermittelte Transformation wurden zunächst 200 μ l der kompetenten Zellen von *E. coli* auf Eis aufgetaut. Die aufgetauten bzw. frisch hergestellten Zellen wurden folgend mit 5-10 μ l Ligationsansatz bzw. 1-3 μ l isoliertem Plasmid versetzt, vorsichtig durchmischt

und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzebehandlung für 90 s bei 42 °C und einer weiteren zweiminütigen Inkubation auf Eis folgte die Zugabe von 800 µl LB-Medium (bei Zellen der Präparation Kap.3.6.1.) bzw. TSS-Medium (RT, bei Zellen der Präparation Kap.3.6.2.). Der Transformationsansatz wurde dann unter leichtem Schütteln für 60 min bei 37 °C in einem Inkubationsschüttler inkubiert. Auf selektive Nähragarplatten wurden anschließend je 100 und 200 µl des Ansatzes ausplattiert und die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.6.4. Selektion rekombinanter E. coli-Klone

Rekombinante *E. coli*-Klone wurden zum einen mit Hilfe der Antibiotikaresistenz und zum anderen über die α -Komplementation der β -Galactosidase selektiert (Sambrook et *al.*, 1989). Aliquots der transformierten *E. coli* Kulturen wurden auf Selektionsagarplatten mit X-Gal (0,004 %), IPTG (2 mM) und dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und nach ihrer Blau/Weiß-Färbung unterschieden. War ein Blau/Weiß-*screening* nicht möglich, so erfolgte die Selektion lediglich über die entsprechende Antibiotikaresistenz.

3.7. Methoden der DNA-Analyse

3.7.1. Sequenzierung

Das zu sequenzierende Konstrukt wurde mit Hilfe des Roche *High Pure Plasmid Isolation* Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) bzw. mit dem *NucleoSpin® Plasmid Präp* Kit von Macherey-Nagel (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) isoliert. Die Sequenzierung selbst erfolgte durch die Firmen MWG Biotech (aktuell jetzt Eurofins MWG Operon, Ebersberg) und GATC (GATC Biotech AG, Konstanz).

3.7.2. Auswertung der Sequenzdaten

Die Sequenzdaten wurden mit dem Programm SeqMan von DNA-STAR erfasst und kontrolliert. Sequenzhomologien zu in Datenbanken aufgeführten Nukleinsäure- und Proteinsequenzen wurden mit dem Algorithmus BLAST (*basic local alignment search tool*; Altschul et *al.*, 1990; Altschul et *al.*, 1997) über das *National Center for Biotechnological Information* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) ermittelt. Die Berechnung der theoretischen

Molekulargewichte und der isoelektrischen Punkte von Proteinen erfolgte mit dem Programm Compute pI/Mw des "*Expasy Molecular Biology Servers*". Multiple Alignments von Proteinen erfolgten mit dem Programm CLUSTAL W (Thompson et *al.*, 1994; Thompson et *al.*, 1997) über das European Bioinformatics Institute (http://www.ebi.ac.uk/clustalw/ index.html). Die Bestimmung physikalischer Daten der bearbeiteten Proteine anhand der Aminosäuresequenz erfolgte mit Hilfe von Programmen des Instituts für Bioinformatik, Genf (http://www.expasy.ch).

3.8. Proteinchemische Methoden

3.8.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976), modifiziert

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte über die Methode nach Bradford (1976). Für das Erstellen einer Kalibriergeraden wurden von einer BSA-Stammlösung (1 mg/ml) Verdünnungen mit 20, 40, 60 und 80 μ g/ml Protein (0 μ g/ml: nur dest. Wasser) hergestellt. Jeweils 100 μ l der Verdünnungen wurden folgend mit 900 μ l Bradford-Reagenz versetzt und nach 10 min Inkubationszeit die Absorption bei 595 nm gemessen.

Von den zu messenden Proteinproben wurden ebenfalls entsprechende Verdünnungen hergestellt und davon 100 μ l mit 900 μ l Bradford-Reagenz versetzt. Als Leerwert diente ein Ansatz, dem 100 μ l dest. Wasser anstelle der Probe zugesetzt wurde. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur konnten die Proben gemessen und die Proteinkonzentration anhand der Kalibriergerade bestimmt werden.

Bradford-Reagenz:	Coomassie Brillant Blue G250	100	mg
	Ethanol (96 %)	50	ml
	Phosphorsäure (85 %)	100	ml
	H ₂ O dest.	ad 1000	ml

Lösung über Nacht ruhen lassen, dann durch einen Faltenfilter filtrieren und dunkel lagern.

3.8.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE nach Laemmli (1970) werden die Proteine zur Analyse durch Kochen und Reduktion der Disulfid-Brückenbindungen durch das im SDS-Probenpuffer enthaltene Mercaptoethanol denaturiert und im Polyacrylamidgel ausschließlich nach ihrer Größe aufgetrennt.

Als Acrylamidlösung wurde eine gebrauchsfertige Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (Roth, Karlsruhe) mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Rotiphorese[®] Gel 30:37,5 % (w/v) Acrylamid: 1 % (w/v) Bisacrylamid.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte in 12 %igen SDS-Polyacrylamidgelen in einer vertikalen Minigel-Elektrophoreseeinheit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

3.8.2.1. Herstellung von Polyacrylamidgelen

Für das Trenngel wurden die Lösungen nach dem unten beschriebenen Schema gemischt, gleichmäßig zwischen die Gelelektrophoreseplatten gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation wurde das Isopropanol entfernt, die Trenngeloberfläche mittels Filterpapier getrocknet, die Sammelgellösung auf das Trenngel geschichtet und der Kamm luftblasenfrei eingesetzt. Falls erforderlich, konnte das fertige Gel in Laufpuffer bei 4 °C gelagert werden.

Ansatz für ein 12 %iges Trenngel:	H ₂ O	1,70	ml
	Gel 30	2,00	ml
	Trenngelpuffer	1,25	ml
	10 % (w/v) SDS	50,00	μl
	10 % (w/v) APS	25,00	μl
	TEMED	2,50	μl
Ansatz für ein 4 %iges Sammelgel:	H_2O	1,525	ml
	Gel 30	0,325	ml
	Trenngelpuffer	0, 625	ml
	10 % (w/v) SDS	25,00	μl
	10 % (w/v) APS	12,50	μl
	TEMED	2,50	μl
Trenngelpuffer:	1,5 M Tris HCl (4×) pH 8,8		
Sammelgelpuffer:	0,5 M Tris HCl (4×)	рН 6,8	

3.8.2.2. Probenvorbereitung und Auftrag

Die Proteinproben wurden mit 3× Probenpuffer versetzt, 10 min bei 95 °C denaturiert und anschließend abgekühlt. Eine Aufbewahrung der Proben über einen längeren Zeitraum war bei -20 °C in Elektrophoresepuffer möglich. Nach Spülen der Probentaschen mit Elektrophoresepuffer wurden 1-100 µg Protein (Probenvolumen 5-20 µl) auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Größenstandard diente unter anderem der Proteinmarker *Precision Plus Protein*TM *unstained Standard* von Biorad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

3× Probepuffer:	15,0	ml 20 % SDS
	15,0	ml 87 % Glycerin
	1,5	ml 2- Mercaptoethanol
	75,0	mg Bromphenolblau
	ad 50	ml H ₂ O dest.
Elektrophoresepuffer:	12,1	g Tris
	7,5	g Glycin;
	1,0	g SDS
	ad 1000	ml H ₂ O dest
	<i>a</i> – .	

Proteingrößenstandards (kDa):

Precision Plus Protein [™] unstained Standard: (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)	250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kD
Precision Plus Protein [™] prestained Standards: (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)	250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10 kD
Page Ruler [™] Prestained Protein ladder: (Fermentas GmbH, St. Leon-Roth)	170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10 kDa

3.8.2.3. Elektrophoresebedingungen

Die PAGE erfolgte in 1× Elektrophoresepuffer. Nachdem die Proben 15 min bei 10 mA pro Gel in das Sammelgel hineingelaufen waren, erfolgte die Auftrennung der Proteine bei 25 mA pro Gel. Wenn die Bromphenolblau-Bande den unteren Gelrand erreicht hatte, wurde das Gel vorsichtig aus der Kammer genommen und die Proteine mit Coomassie Brillant Blue gefärbt.

3.8.2.4. Färbung von Polyacrylamidgelen

Durch Anfärbung der Polyacrylamidgele mit Coomassie-Lösung konnten die aufgetrennten Proteine sichtbar gemacht werden. Nach mindestens 30-minütiger Inkubation unter leichtem Schütteln bei RT wurde die Färbelösung durch die Entfärbelösung ausgetauscht. Unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung wurde das Gel bis zur vollständigen Entfärbung des Hintergrundes inkubiert.

Coomassie-Färbelösung:	40 % Is	opropano	ol			
	10 % E	ssigsäure				
	0,1 % (v	w/v) Coor	nassie R2	250		
Die Lösur	ng über	Nacht	ruhen	lassen	und	dann
einen Falten	filter filtrie	eren.				

Entfärbelösung: 20 % Essigsäure

3.8.2.5. Trocknen von Polyacrylamidgelen

Polyacrylamidgele wurden vorsichtig auf angefeuchtetes Filterpapier (Hybond Blotting Papier, Amersham Bioscience/GE Healthcare Europe GmbH, München oder Blotting Papier von VWR International GmbH, Darmstadt) gelegt und unter Vakuum und Hitzeeinfluss getrocknet. Dies erfolgte für 2 Stunden bei 80 °C und ca. 130 mbar im Slab Dryer, Model 483 von Biorad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

3.8.2.6. Größenbestimmung von Proteinbanden im SDS-Gel mittels Rf-Wert

$$\mathbf{R_f} = \mathbf{S_x} / \mathbf{S_f}$$
 $\mathbf{S_x} = \text{Wanderungsstrecke der Proteinbande,}$
 $\mathbf{S_f} = \text{Gesamtlänge des Gels (bis Lauffront)}$

Um eine lineare Beziehung zwischen der Wanderungsstrecke von Proteine und ihrem Molekulargewicht zu erhalten, wurden die R_{f} -Werte der Banden des Proteingrößenstandards berechnet und gegen die Logarithmen ihres entsprechenden Molekulargewichts aufgetragen (Abb. 3.1). Nach dem Erstellen einer Näherungsgeraden und dem Erhalt der entsprechenden Gleichung konnte dann das Molekulargewicht von Proteinbanden berechnet werden.

durch



Abb. 3.1: Beispiel einer Geradenermittlung zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinbanden im SDS-Gel

3.8.3. Umpuffern von Proteinlösungen

Für das Umpuffern von Proteinlösungen kamen PD10 Entsalzungssäulen (*Desalting column*, Amersham Biosciences/GE Healthcare Europe GmbH, München) zum Einsatz. Diese sind mit dem Makromolekülmaterial Sephadex (Sephadex[™] G-25 Medium) gefüllt, welches einen Molekularsiebeffekt besitzt. Die Entsalzung erfolgt dadurch, dass größere Moleküle wie Proteine im Ausschlussvolumen des Säulenmaterials eluieren, während die kleineren Moleküle wie Salze in den Poren des Gelfiltrationsmaterials diffundieren können und später eluieren.

Die jeweilige Säule wurde mit 25 ml dest. Wasser gespült und mit 25 ml des gewählten Elutionspuffers äquilibriert. Folgend wurde die Säule mit 2,5 ml Probe beladen und diese mit 3,5 ml Elutionspuffer eluiert. Es folgte eine Bestimmung der Proteinkonzentration bzw. ein Aufkonzentrieren der Probe. Zur Lagerung wurde die Säule zunächst mit 25 ml dest. Wasser und folgend mit 20 % igem Ethanol gespült. Die Säule wurde auf 20 % Ethanol bis zur erneuten Verwendung im Kühlschrank gelagert.

3.8.4. Konzentrierung von Proteinlösungen

Zur Aufkonzentrierung von Proteinlösungen fanden die Vivaspin Zentrifugationseinheiten (Vivaspin 2) von Vivaspin Vivascience (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen) Anwendung. Diese Vivaspin Zentrifugalkonzentratoren sind Ultrafiltrationseinheiten zur Konzentrierung biologischer Proben und standen mit den Membran-Ausschlussgrenzen von 10 und 30 kDa zur Verfügung.

Die entsprechende Proteinprobe wurde in den Konzentrator gegeben, und bei 3000 rpm und 4 °C (Sigma Zentrifuge Typ 4K15 Rotor 402/D, SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Osterode)

zentrifugiert. In regelmäßigen Abständen erfolgten eine Kontrolle des Füllstandes und gegebenenfalls ein Auffüllen der Proteinlösung. Wurde die gewünschte Konzentrierung erreicht, so konnte das Konzentrat direkt aus dem Vivaspinröhrchen herauspipettiert oder durch Umkehrung der vertikalen Orientierung des Säulchens und anschließende Zentrifugation (3000 rpm, 2 min, 4 °C) in das *concentrate recovery cap* erhalten werden.

Für das Einengen und damit Aufkonzentrieren von größeren Volumina wurden die Amicon[®]-Zellen (Millipore GmbH, Schwalbach) und Flachmembranen aus regenerierter Zellulose (YM10-Membran) entsprechenden Durchmessers (Millipore GmbH, Schwalbach) verwendet. Bei einem Überdruck von 2 bar (Stickstoff) wurde die Proteinprobe auf das gewünschte Volumen eingeengt. Die verwendete Membran (10 oder 30 kDa) wurde mit Wasser und folgend mit 20 %igem Ethanol gespült. Bis zur erneuten Verwendung wurde sie in Ethanol im Kühlschrank gelagert.

3.8.5. Transfer von Proteinen auf Membranen - Western-Blot

Die Übertragung von Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen auf eine PVDF-Membran (PVDF Western Blotting Membranes von Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) erfolgte mit einer Mini Trans-Blot Cell bzw. der Trans-Blot Cell der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)

Nach Beendigung der elektrophoretischen Trennung wurde das SDS-Gel 15 bis 30 min im Transferpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 15 % Methanol) inkubiert. Die auf Gelgröße zurechtgeschnittene Membran wurde währenddessen nacheinander 3 s in Methanol, 1-5 min in Wasser und 10-30 min in Transferpuffer geschwenkt. Anschließend folgte der Aufbau der Apparatur nach folgender Schichtung von der Anode (+ Pol, weißer Deckel der Apparatur) aus: Transferpuffer-getränktes Kunstfasertuch, Transferpuffer-getränktes Whatman-Papier (Hybond Blotting Papier, Amersham Bioscience/GE Healthcare Europe GmbH, München), PVDF-Membran, Polyacrylamidgel, getränktes Whatman-Papier und das mit Transferpuffer getränkte Kunstfasertuch. Der Transfer erfolgte bei 4 °C in der großen Apparatur bei 70 V für 2 Stunden und in der kleinen Apparatur bei 100 V für 1 Stunde.

3.8.5.1. Nachweis der Biotin-haltigen Untereinheit von Proteinen

Der Nachweis der Expression von Biotin-haltigen Enzymen erfolgte unter Verwendung des Streptavidin-AP-Konjugates von Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Das Streptavidin aus *Streptomyces avidinii* ist über einen heterobifunktionalen Linker an die alkalische Phosphatase (AP) aus Kälberdarm gekoppelt, über welche der Nachweis der entsprechenden Proteine ermöglicht wird.

Nach dem Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Western Blot Membran (Kap.3.8.5.) wurde diese 2× 10 min in TBS Puffer gewaschen und dann für 60 min in 50 ml Blocking-Puffer inkubiert. Daran schloss sich die 60-minütige Inkubation der Membran mit dem in frischer Blocking-Lösung verdünntem Streptavidin-AP-Konjugat von Roche an. Es folgte das Waschen der Membran in TTBS (4× 15 min), und wiederholt in TBS (1× 15 min). Die Detektion der über das Streptavidin gebundenen Proteine erfolgte über den Nachweis der alkalischen Phosphatase. Hierfür wurde die Membran im Detektionspuffer mit NBT und BCIP im Dunkeln inkubiert. Nachdem die Banden die gewünschte Intensität erreicht hatten, folgte das Stoppen der Reaktion durch intensives Spülen der Membran mit Wasser. Die Membran wurde anschließend getrocknet und im Dunkeln gelagert.

TBS Puffer:	100 mM Tris HCl, pH 7,5 150 mM NaCl, gelagert bei 4 °C
Blocking-Puffer:	0,1 % Tween20 in TBS Puffer5 % Magermilchpulver
Antikörper-Lösung:	Blocking-Puffer (frisch) 1:1000 verdünntes Streptavidin- AP-Konjugat
TTBS:	0,1 % Tween20 in TBS Puffer gelagert bei 4 °C
Detektionspuffer:	100 mM Tris HCl, pH 9,0 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ gelagert bei 4 °C
Detektionslösung	20 ml Detektionspuffer 40 μl NBT 33 μl BCIP

NBT:	<i>p</i> -Nitrotetrazoliumblauchlorid 100 mg/ml in 70 % DMF
BCIP:	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat- <i>p</i> -toluidinsalz 50 mg/ml in DMF

3.8.5.2. Nachweis von His-Tag Fusionsproteinen

Der Nachweis der Expression von His-*Tag* Fusionsproteinen erfolgte mittels His-*Tag* Antikörper der Firma Gene Tex Inc. (Irvine, CA, USA)

Die Membran wurde nach der Übertagung der Proteine 2×10 min in TBS Puffer gewaschen und dann 60 min oder über Nacht in Blocking-Puffer schüttelnd inkubiert. Es folgte eine 60-minütige Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper 6× His-*Tag* von Gene Tex Inc. Der Antikörper wurde an dieser Stelle 1:350 in frischer Blocking-Lösung verdünnt. Im Anschluss daran wurde die Membran 4× für 15 min in TTBS gewaschen. Daran schloss sich die Inkubation der Membran mit dem sekundären Antikörper (60 min, Anti-Maus 1:100 verdünnt, Sigma, Taufkirchen) an. Es folgte das Waschen der Membran in TTBS (4× 15 min), und anschließend in TBS (1× 15 min). Die Detektion der alkalischen Phosphatase erfolgte wie bereits im Abschnitt 3.8.5.1. beschrieben mittels NBT und BCIP im Dunkeln in Detektionspuffer.

primäre Antikörper-Lösung:	Blocking- Puffer (frisch)	
	1:350 verdünnter 6× His-Tag Antikörper	
sekundäre Antikörper-Lösung:	1:100 verdünnt in TTBS	

3.9. Induktion der Proteinsynthese und Gewinnung von Wildtypproteinen

3.9.1. Anzucht von Pseudomonas

Für die Anzucht von *P. aeruginosa* und *P. citronellolis* wurden Schikane-Klettkolben verwendet. Die Kultivierung der Vorkulturen erfolgte über Nacht in 50 ml Mineralmedium nach Schlegel et *al.* (1961) mit 0,5 % Glukose unter Schütteln bei 30 °C. Hauptkulturen (150 ml Medium) wurden mit Material der Vorkultur angeimpft, sodass ca. 25-30 Kletteinheiten erhalten wurden. Die Zellen wurden unter Schütteln bei 30 °C angezogen und gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase geerntet (Sigma Zentrifuge Typ4K15 (Rotor

402/D), 25 min, 5100 rpm, 4 °C). Die Inkubationszeit der Hauptkultur war abhängig von der verwendeten C-Quelle und der daraus resultierenden Wachstumsgeschwindigkeit. Sollten die Zellen auf Glukose angezogen werden, so erfolgte das Animpfen der Kulturen in der Früh, ein Wachsen über den Tag und die Ernte der Zellen am Abend des gleichen Tages. Die verwendete Glukosekonzentration lag in diesem Fall bei 0,5 %. Wurden die Zellen jedoch zur Induktion des Atu- und/oder Liu-Stoffwechselweges mit Citronellsäure (Na-Citronellat, 10 %ige Lösung, mit NaOH titriert auf ca. pH 7), Geranylsäure (Na-Geranylat, 10 %ige Lösung, mit NaOH titriert auf ca. pH 7) bzw. Isovaleriansäure (Na-Isovaleriat, 4 %ige Lösung, mit NaOH titriert auf ca. pH 7) als C-Quelle angezogen, so war das Animpfen der Kultur am Abend erforderlich. Die entsprechenden Übernacht-Vorkulturen (0,5 % Glukose) wurden bis zu ihrer Verwendung auf Eis gelagert. Um ein Anwachsen der Zellen zu gewährleisten, erfolgte die Zugabe von zusätzlich 0,075 % Glukose neben der verwendeten titrierten Säure (Konzentration im Medium 0,15 %) als C-Quelle zum Medium. Die Zellen wurden an dieser Stelle über Nacht inkubiert und im Verlauf des folgenden Tages geerntet.

3.9.2. Zellaufschluss von Pseudomonas

Für den Aufschluss der Zellen wurden diese in 1 ml/g 0,1 M HEPES-Puffer pH 7,5 auf Eis resuspendiert. Weiterhin erfolgte die Zugabe von 100 μ l DNase (1 mg/ml), 50 μ l RNase (10 mg/ml) und 100 μ l 10 mM MgCl₂. Nach einer Inkubation von ca. 30 min auf Eis wurde die Zellsuspension 3× mit Hilfe der kleinen vorgekühlten Zelle der French-Presse (French[®] Pressure cell press, American Instrument Industrie Company, Urbana, Illinois) bei 800 Ib/in² (psi) aufgeschlossen. Für den Aufschluss von *P. aeruginosa* (S2-Organismus) stand ein geschlossenes Auffanggefäß zur Verfügung, wodurch das Entweichen von Aerosolen verhindert wurde. Für das Abtrennen von Zelltrümmern und Membranbestandteilen wurde die Zellsuspension bei 35000 rpm in der Beckman Zentrifuge (Beckman Optima[™] LE-80K Ultrazentrifuge, Rotor TFT65.13, Beckman Coulter GmbH, Krefeld) bei 4 °C für 1 Stunde zentrifugiert. Der Überstand wurde als löslicher Rohextrakt für weitere Analysen verwendet.

3.9.3. Aufreinigung von Biotin-haltigen Proteinen

Biotin-haltige Proteine aus den löslichen Zellextrakten (Rohextrakt) der Stämme *P. aeruginosa* und *P. citronellolis* wurden über das Säulenmaterial *ImmunoPure*[®] *Immobilized Monomeric* Avidin Gel (PIERCE, Rockford, USA) aufgereinigt. Eine kleine Säule wurde mit einem Säulenvolumen von 0,5 ml *immobilized monomeric* Avidin gepackt und mit Na-Phosphatpuffer (PBS-Puffer, 5 Säulenvolumen [SV]) äquilibriert. Es folgte das Beladen der Säule mit 1 ml Rohextrakt, das Waschen mit PBS-Puffer (10 SV, 5× 1 ml) und die Elution gebundener Proteine (5 SV Elutionspuffer). Die Säule konnte durch das Waschen mit Regenerationspuffer (5 SV) regeneriert werden. Gelagert wurde die Säule im Kühlschrank auf PBS-Puffer mit 0,01 % Natriumazid (3-5 SV). Die erhaltenen Proben konnten im Anschluss mittels SDS-PAGE (Kap.3.8.2.) bzw. gegebenenfalls mittels Western-Blot (Kap.3.8.5.) analysiert werden.

PBS-Puffer:	0,10 M Natriumphosphat 0,15 M NaCl, pH 7,0
Elutionspuffer:	0,1 M PBS-Puffer, pH 7,0 2 mM D-Biotin

Regenerationspuffer: 0,1 M Glycin HCl, pH 2,8

3.10. Heterologe Expression und rekombinante Synthese von Proteinen

3.10.1. His-Tag Fusionsproteine

Die Synthese und Reinigung rekombinanter Proteine mit einem C-terminalen His-*Tag* erfolgte unter Verwendung des Vektors pJoe4036.1 in Verbindung mit dem Stamm *E. coli* JM109 und mit einem N-terminalen His-*Tag* unter Verwendung der Vektoren pET28a bzw. pCOLA Duet^M-1 in Verbindung mit dem Stamm *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS RARE.

3.10.2. Durchführung einer Testexpression

Klone, die das gewünschte Plasmid enthielten, wurden in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 30 °C über Nacht kultiviert. Die Hauptkultur (30 ml) wurde mit Material aus einer Vorkultur 1 % ig angeimpft und bei 30 °C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Das Wachstum der Kultur wurde photometrisch bei 600 nm verfolgt. Die Induktion der Expression in den Kulturen der pET28a- bzw. pCOLA DuetTM-1-Konstrukte erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,8 mit 1 mM IPTG-Lösung, die der pJoe4036.1-Konstrukte bei einer OD₆₀₀ von 0,3 bis 0,5 mit 0,2 % Rhamnose. Die Kultivierung erfolgte im Anschluss daran für 6 h. Jede Stunde wurde eine Probe von 1,1 ml entnommen. 100 µl wurden für die OD-

Bestimmung verwendet, die übrigen 1 ml Zellen durch Zentrifugation (Tischzentrifuge 5417C, Rotor 45-30-11 Eppendorf AG, Hamburg) für 3 min geerntet und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Die Kontrolle der Expression erfolgte mittels SDS-PAGE (Kap.3.8.2.). Hierfür wurde dem Zellpellet aus 1 ml Kultur ein Volumen an $OD_{600} \times 0,1$ Puffer (50 mM Tris HCl, pH 8,0) zugesetzt. 10 µl des resuspendierten Pellets wurden mit 5 µl 3× SDS-*Loading*-Puffer versetzt, für 10 min bei 95 °C denaturiert und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Konnte eine Expression des Gens und damit eine Synthese des entsprechenden Fusionsproteins festgestellt werden, so wurde eine Vorkultur für die eigentliche Überexpression angesetzt.

3.10.3. Zellanzucht, Induktion der Expression und Zellernte

Für die Gewinnung von rekombinantem Protein im großen Maßstab wurde eine Hauptkultur von 400 ml LB-Medium mit Material einer Übernachtkultur (ca. $OD_{600} = 0,1$) angeimpft und bis zu einer OD_{600} von 0,5-0,8 (pET28a- bzw. pCOLA DuetTM-1-Konstrukte) bzw. 0,3-0,5 (pJoe4036.1-Konstrukte) bei 30 °C inkubiert. Bei Erreichen dieser optischen Dichten folgte die Induktion der Expression mit 1 mM IPTG (pET28a- bzw. pCOLA DuetTM-1-Konstrukte) bzw. mit 0,2 % Rhamnose (pJoe4036.1-Konstrukte). Bei der Expression der Dehydrogenase-bzw. der Carboxylase-Gene erfolgte zu diesem Zeitpunkt zusätzlich die Zugabe von Riboflavin (1 µg/ml) bzw. von Biotin (1 µg/ml). Die Kulturen wurden für weitere 5-6 Stunden bei 30 °C unter Schütteln inkubiert, im Anschluss auf Eis gekühlt, folgend durch Zentrifugation (30 min, 8000 rpm, 4 °C, AvantiTM J-25 Zentrifuge und JA-10 Rotor (beides Beckman Coulter GmbH, Krefeld) geerntet und das Zellmaterial bei -20 °C gelagert.

3.10.4. Zellaufschluss und Gewinnung des Rohextraktes

Das Zellmaterial wurde zunächst auf Eis aufgetaut und folgend in 1 ml/g 0,1 M HEPES Puffer pH 7,5 resuspendiert. Bei einem Aufschluss mittels *French*-Presse erfolgte weiterhin die Zugabe von DNaseI (100 μ l/g), RNaseA (50 μ l/g) und MgCl₂ (100 μ l/g). Bei einem Aufschluss mittels Ultraschall war dies nicht erforderlich.

DNaseI	1 mg/ml		
RNaseA	10 mg/ml		
MgCl ₂	10 mM		

Der Zellaufschluss mittels *French*-Presse wurde wie im Abschnitt 3.9.2. für *Pseudomonaden* beschrieben, so auch für die verwendeten *E.coli* Stämme durchgeführt. Je nach Volumen der Zellsuspension wurde hier die kleine (3,3ml; 800 Ib/in² (psi)) oder die große Zelle (36 ml; 1100 Ib/in² (psi)) verwendet.

Weiterhin war der Aufschluss über Ultraschall möglich. Hierfür wurde die auf Eis gekühlte Zellsuspension 4× 20 s und mit je 15 s Pause (Cycle 50 %, Power: MS 73/D) mit dem Gerät Sonoplus HD200 (Leistung: 200 W, Frequenz 20 kHz) und der Spitze MS 73/D der Firma Bandelin (Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin) beschallt.

Nach erfolgtem Zellaufschluss wurde die Zellsuspension eine Stunde in der Beckman Ultrazentrifuge Optima[™] LE-80K bei 35000 rpm unter Verwendung des Rotors TFT65.13 bei 4 °C zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation erhaltenen Rohextrakte (löslichen Bestandteile) wurden auf Eis im Kühlraum gelagert und konnten im Folgenden weiter aufgereinigt werden.

3.10.5. Proteinreinigung über Nickel-NTA Agarose

Die rekombinanten Proteine, welche mit einem C- bzw. N-terminalen His-*Tag* versehen wurden, konnten mittels Affinitätschromatographie über Ni-NTA Agarose aufgereinigt werden. Im kleinen Maßstab wurden hierfür *Gravi-Flow*-Säulchen (Qiagen GmbH, Hilden) mit einem Säulenvolumen von 1 ml verwendet. Im großen Maßstab kam es zur Verwendung der FPLC-Anlage (Amersham Biosciences/GE Healthcare Europe GmbH, München) und entsprechender Fertigsäulen (5 ml).

3.10.5.1. Aufreinigung über Gravi-Flow-Säulchen

Die Aufreinigung im kleinen Maßstab erfolgte über *Gravi-Flow*-Säulchen mit einem Säulenvolumen (SV) von 1 ml Ni-NTA Agarose (beides Qiagen GmbH, Hilden). Um ein Überladen des Säulenmaterials zu verhindern, wurden die entsprechenden Säulen mit 50 mg Rohextrakt mindestens jedoch mit 1 ml zur Reinigung der Fusionsproteine beladen. Bei einem größeren Volumen an Rohextrakt waren mehr Säulendurchgänge erforderlich.

Die Säule wurde zunächst mit 5 SV dest. Wasser gespült und folgend mittels 5 SV Lysispuffer (10 mM Imidazol) äquilibriert. Es folgte das Beladen der Säule mit Rohextrakt. Anschließend wurde die Säule mit 4 SV Lysispuffer und folgend mit 4 SV Waschpuffer gewaschen, wodurch nicht an die Säule gebundene Proteine von dieser entfernt wurden. Die Elution von Protein erfolgte über einen Gradienten mit steigender Imidazol-Konzentration. Dabei kamen Elutionspuffer mit 50, 100, 150, 200, 250 und 500 mM Imidazol zur Anwendung, wobei jeweils 4 SV auf die Säule gegeben wurden. Imidazol konkurriert mit den sechs Histidin-Resten des *Tags* um die Bindung an das Ni-NTA Material und führt somit zum Ablösen des Fusionsproteins. Die aufgefangenen Fraktionen von Wasch- und Elutionsschritten wurden auf Eis gelagert und mittels SDS-PAGE (Kap.3.8.2.) analysiert. Zur Lagerung der Säule wurde diese mit 8 SV dest. Wasser und 5 SV 20 % Ethanol gespült. Die Säule wurde auf 20 % Ethanol stehend im Kühlschrank aufbewahrt.

Lysispuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄
	300 mM NaCl
	10 mM Imidazol, pH 8
Waschpuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄
-	300 mM NaCl
	20 mM Imidazol, pH 8
Elutionspuffer 1:	50 mM NaH ₂ PO ₄
•	300 mM NaCl
	50 mM Imidazol, pH 8
Elutionspuffer 2:	Elutionspuffer 1
Ĩ	mit 100 mM Imidazol, pH 8
Elutionspuffer 3:	Elutionspuffer 1
I I I I I I I I I I I I I I I I I I I	mit 150 mM Imidazol, pH 8
Flutionspuffer 1.	Elutionspuffer 1
Liutionspurier 4.	mit 200 mM Imidazol, pH 8
	~ 1
Elutionspuffer 5:	Elutionspuffer 1
	mit 250 mM Imidazol, pH 8
Elutionspuffer 6:	Elutionspuffer 1
T T	mit 500 mM Imidazol, pH 8
	mit 500 mit mitazoi, pi 0

Für jedes Protein stand in der Regel eine Säule zur Verfügung. War dies nicht der Fall bzw. wurde sehr viel Protein aufgereinigt (Farbänderung des Materials von hellblau zu bräunlich grau), so wurde es erforderlich, die entsprechenden Säulen zu regenerieren. Hierfür wurde die Säule nach dem folgenden Protokoll behandelt.
5 Säulenvolumen H ₂ O dest
3 SV 2 %ige SDS-Lösung
1 SV 25 % Ethanol
1 SV 50 % Ethanol
1 SV 75 % Ethanol
5 SV 100 % Ethanol
1 SV 75 % Ethanol
1 SV 50 % Ethanol
1 SV 25 % Ethanol
1 SV H ₂ O dest
5 SV 100 mM EDTA pH 8,0
spülen mit H ₂ O dest
2 SV 100 mM NiSO ₄
2 SV Wasser

Die so frisch generierte Säule stand einer weiteren Aufreinigung direkt zur Verfügung oder wurde bis zur erneuten Verwendung im Kühlschrank auf 20 %igem Ethanol gelagert.

3.10.5.2. Aufreinigung über FPLC (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg)

1.

Die Affinitätschromatographie und die sich anschließende Umpufferung wurde bei Raumtemperatur mit Hilfe der FPLC-Anlage ÄKTA Purifier der Firma Amersham Biosciences/GE Healthcare Europe GmbH (München) durchgeführt.

Säulenmaterial:	Ni Sepharose [™] 6 Fast Flow
- Säule:	HisTrap FF 5 ml, 1.6×2.5 cm
- Flussrate:	0,5 ml/min bis 5 ml/ min
- Fraktionen:	Waschfraktion á 5 ml; Elutionsfraktionen á 2 ml
- Eluent: A:	20 mM NaH ₂ PO ₄
	500 mM NaCl
	20 mM Imidazol, pH 7,4
2	
B:	$20 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$
	500 mM NaCl
	500 mM Imidazol, pH 7,4

- Programm:		1. Proben Auftrag (1-0.5 ml/min)
		2. Waschen mit Eluent A (3 ml/min, 5 SV)
		3. Elution (2 ml/min)
		linearer Gradient bis 50 % Eluent B, 10 SV;
		100 % Eluent B, 5 SV
		Fraktiongröße: 2 ml
		4. Waschen mit Eluent A, 5 ml/min, 2 SV
2.	Säulenmaterial:	Sephadex [™] G–25 Fine
	- Säule:	HiPrep 26/10 Desalting, 2.6×10 cm (GE Healthcare)
	- Flussrate:	2-8 ml/min
	- Fraktionen:	2 ml
	- Eluent: A:	50 mM Tris HCl, pH 8,5
	- Programm:	1. Proben Auftrag (2 ml/min)
		2. Waschen mit Eluent A, 8 ml/min, 1,3 SV
		Fraktiongröße: 2 ml

3.11. Synthese von CoenzymA-Estern

Die Synthese von CoenzymA-Estern erfolgte nach der Gemischten-Anhydrid Methode beschrieben durch Guan et *al.* (1999; Förster-Fromme et *al.*, 2006). Im Folgenden ist sie am Beispiel der Darstellung des Geranyl-CoA Esters beschrieben.

In einem Becherglas wurde zunächst die Geranylsäure (135 μ l, 770 μ mol, 168,24 g/mol, d 0,96 g/ml) in Tetrahydrofuran (THF, 5,1 ml) gelöst und durch Zugabe der equimolaren Menge an Triethylamin (107 μ l, 770 μ mol, 101,19 g/mol, d 0,73 g/ml) neutralisiert. Es folgte die Zugabe von Ethylchlorformiat (73 μ l, 770 μ mol, 108,52 g/mol, d 1,14g/ml) und das Stehenlassen des Ansatzes für 30 min bei Raumtemperatur (RT). Der Reaktionsansatz wurde im Anschluss durch Glaswolle filtriert. Parallel erfolgte das Lösen des CoenzymAs (23,8 mg, 29 μ mol, 821,34 g/mol) in einem 12 ml Wasser:THF Gemisch (3:2). Durch Zugabe von festem Natriumhydrogencarbonat wurde ein pH-Wert von ca. 8,0 eingestellt. Das Geranylsäure-Anhydrid enthaltende Filtrat konnte nun vorsichtig zur CoA-Lösung getropft werden. Der Ansatz wurde folgend für 25 min bei RT gerührt. Es folgte das Zutropfen von 4 ml Wasser und das Einstellen des pH-Wertes auf ca. 3,0 unter Verwendung von 2 N HCl.

Die Reaktionslösung wurde anschließend zur Entfernung von noch freiem Anhydrid mit Diethylether (3×, ca. 20 ml) extrahiert. Reste von THF in der wässrigen Phase wurden am Rotationsverdampfer abgezogen, der Rückstand für 1 Stunde bei -80 °C eingefroren und folgend durch Lyophilisation (Christ ALPHA I-5, Osterode) über 24 Stunden getrocknet.

Die erfolgreiche Synthese wurde durch die Messung der vorhergesagten Massen mittels HPLC-(ESI)-MS Analyse bestätigt. Erhaltenes CoA Ester wurde bei -20 °C gelagert.

Das CoenzymA-Salz wurde von Calbiochem über die Firma VWR (VWR International GmbH, Darmstadt) bezogen.

3.12. Analytische Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC-Untersuchungen wurden an einem computergesteuerten System der Firma Agilent (Agilent1100, Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen) durchgeführt.

Software:ChemStation for LC 3D systems. Rev. B.0103SR1 (204)Säule:Lichrospher 100, RP-18, encapped, 5 μm, 250x4,0 mmSäulentemperatur:30 °C oder 25 °C

Die HPLC Analyse kam bei verschiedenen Fragestellungen zum Einsatz. Daher wurden verschiedene Laufmittel und Programme verwendet. Die einzelnen Details werden folgend aufgeführt.

3.12.1. Trennung von CoA-Estern

a) Programm: CoAEster.M

In Anlehnung an die Arbeit von Chattopadhyay (2007, King et *al.*, 1988) wurde das folgende Programm zur Trennung von verschiedenen CoA-Estern verwendet.

Laufmittel A:	0,2 M Na-Phosphatpuffer, pH 5
Laufmittel B:	80 % 0,25 M Na-Phosphatpuffer, pH 5 20 % Acetonitril
Flussrate:	0,7 ml/min
Injektionsvolumen:	5 μl bzw. 15 μl
Detektion:	254 nm

Zeit [min]	Laufmittel A	Laufmittel B
0	97 %	3 %
2,5	97 %	3 %
40	10 %	90 %
43	10 %	90 %
48	97 %	3 %
60	97 %	3 %

Programm:

Das Programm wurde gegebenenfalls modifiziert. Details werden an entsprechender Stelle angegeben.

b) Programm: CoAEster2.M

Das Programm nach Förster-Fromme et *al.* (2006) wurde vergleichend zu den Laufbedingungen der HPLC-(ESI)-MS Analyse verwendet.

Laufmittel A:	98 % 10 mM Ammoniumformiat
	2 % Methanol
Laufmittel B:	Acetonitril
Flussrate:	0,2 ml/min, 0,7 ml/min
Injektionsvolumen:	5-15 μl
Detektion:	254 nm

Programm:

Zeit [min]	Laufmittel A	Laufmittel B
0	97 %	3 %
3	97 %	3 %
20	0 %	100 %
24	0 %	100 %
30	97 %	3 %
45	97 %	3 %

c) Programm: CoAEster3.M

Ein letztes Programm, das verwendet wurde um CoA-Ester zu untersuchen, wurde nach Holtzapple & Schmidt-Dannert (2007) modifiziert.

Laufmittel A:	20 mM Ammoniumacetat, pH 5,4
Laufmittel B:	Acetonitril:Methanol 85:15
Flussrate:	1 ml/min

Injel	cti	onsvolumen:	1	5	μl

Detektion:	254 nm

Programm:

Zeit [min]	Laufmittel A	Laufmittel B
0	97 %	3 %
2	97 %	3 %
22	50 %	50 %
25	50 %	50 %
27	97 %	3 %
30	97 %	3 %

3.12.2. Trennung von Nukleotiden

Durch die Reaktion der Carboxylase-Enzyme wird nicht nur die Carboxylierung der entsprechenden Substrate, sondern auch ein Verbrauch und damit eine Konzentrationsänderung an ATP bewirkt. Um diese Änderung für einen möglichen Nachweis der Reaktion zu nutzen, war es erforderlich die Trennung der Nukleotide AMP, ADP und ATP zu untersuchen. Dies erfolgte mittels der im Folgenden angeführten Bedingungen (modifiziert nach Handrick et *al.*, 2004)

Programm: Nucleotid.Assay1.M

Säule:	C ₈ -Gromsil 100, 5 μm, 125×4 mm
Laufmittel A:	80 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6: Methanol 77:23 +/- 5 mM Tertbutylammoniumhydrogenphosphat (TBAHS)
Flussrate:	0,7 ml/min
Injektionsvolumen:	10 µl
Detektion:	260 nm

Programm:

Zeit [min]	Laufmittel A	Laufmittel B
0 min	100%	0 %
10 min	100 %	0 %

Da das CoA-Ester Substrat des Carboxylase Assays relativ teuer ist, sollte zunächst erst einmal die Analytik über eine einfachere Reaktion getestet werden. Hierfür bot sich die Hexokinase-Reaktion, in welcher eine Hexose mit ATP zu Hexose-6-phosphat und ADP umgesetzt wird, an (Kap.3.14.4.).

3.13. HPLC-(ESI)-MS Analyse von CoA Verbindungen

Um die Synthese der verschiedenen selbsthergestellten CoA-Ester zu kontrollieren, wurden diese über eine Kopplung von HPLC und Massenspektroskopie (MS) untersucht. Es handelte sich dabei um eine Elektronen-Spray-Ionisations MS, bei welcher die Probenmoleküle in einem elektrischen Feld ionisieren. Im ESI⁺-Modus lagert sich dabei ein zusätzliches Proton an die Verbindung an, im ESΓ-Modus löst sich ein Proton ab. Die Messungen wurden dank der freundlichen Unterstützung von Herrn Dr. Armbruster am Institut für Lebensmittelchemie der Universität Hohenheim durchgeführt.

Die LC-(ESI)-MS wurde hier mittels einer HPLC an einem HP1100 HPLC-System von Agilent (Agilent Technologies Deutschland GmbH, Böblingen) bestehend aus einem HP1100 Autosampler, einer HP1100 Gradient Pumpe, einem HP1100 Säulen Thermoregulator und einem HP1100 *Diode array detector* (DAD) Modul, gekoppelt mit einem *Micromass VG II quadrupole* Massenspektrometer ausgestattet mit einem Elektrospray (ESI) Interface durchgeführt.

Chromatograpische Bedingungen:

Säule:	Hypersil gold C18 1,9 μ m (Thermo electron) 50×2,1 mm
Säulentemperatur:	25 °C
Flussrate:	0,2 ml/min
Injektionsvolumen:	5 µl
Elutionsgemisch:	(A) 10 mmol Ammoniumformiat: Methanol 98 + 2 (v/v),
	(B) Acetonitril; Gradient: % B (t [min]) 3 (0-3) – 100 (20-24)

MS Parameter:

Esi⁻ Ausgangs-Temperatur 120 °C Kapillare 3.0 kV HV linse 0,5 kV Innenringspannung 50 V

Für die Datenerfassung wurde die MasLynx 3.2 Software verwendet. Die Analyse der Proben war auf zwei Wegen möglich. Zum einen konnten für Peaks im DAD-Chromatogramm zeitlich passende Peaks im Massenspektrogramm gesucht werden. Hier musste beachtet werden, dass die ESI-MS Analyse um einige Sekunden zeitversetzt zum DAD erfolgte. Daher

wurde bei den Masse-Peaks mit etwas längeren Retentionszeiten gerechnet. Mit Hilfe des Computerprogramms konnten die Massen der entsprechenden Peaks eingesehen werden. Ein anderer Weg war die gezielte Suche nach entsprechenden Massen in den analysierten Proben.

3.14. Messung von Enzymaktivitäten

3.14.1. Messung der Citronellyl-CoA Dehydrogenase

Die Aktivität der Citronellyl-CoA Dehydrogenase (CCoA-DH) wurde über die Reduktion von 2,6-Dichlorphenol-indophenol (DCPIP) bei einer Wellenlänge von 600 nm und 30 °C, wie bei Engel (1981) beschrieben, jedoch etwas modifiziert gemessen (Förster-Fromme et *al.*, 2008; Förster-Fromme & Jendrossek, 2008).

Der Ansatz enthielt in einem Reaktionsvolumen von 1 ml: 100 mM Natriumphosphat Puffer, pH 7,0; 15 μ l 10 mM DCPIP; 10 μ l 10 mM Phenazinmethosulfat (PMS); 10 μ l 1 mM Flavinadenindinukleotid (FAD) und 5-10 μ l Enzymlösung (ca. 15-60 μ g). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l 5 mM Citronellyl-CoA (CCoA) gestartet. Für die Berechnung der Enzymaktivität wurde der Extinktionskoeffizient für DCPIP mit $\epsilon = 22 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Armstrong, 1964) verwendet.

3.14.2. Messung der Geranyl-CoA- und der Methylcrotonyl-CoA Carboxlase

Die Aktivitäten der beiden Carboxylasen des Abbauweges linearer Terpenoide (Geranyl-CoA- [GCase] und Methylcrotonyl-CoA Carboxylase [MCase]) wurden optisch durch die Abnahme der NADH+H⁺ Konzentration bei 340 nm (30 °C) in einem gekoppelten Assay, beschrieben durch Fall (1976), bestimmt.

Die Enzymmessung der Geranyl-CoA Carboxylase beruht auf folgenden Reaktionen:



Für die Messung der MCase wurde anstelle des Geranyl-CoAs (GCoA) Methylcrotonyl-CoA (MCoA) als Substrat eingesetzt. In diesem Falle stand sowohl selbsthergestelltes, als auch kommerziell erhältliches Substrat zur Verfügung, wodurch über diese Reaktion das selbsthergestellte Substrat kontrolliert und bei vergleichbaren Aktivitäten beider Substrate somit auf den Erfolg der Synthese (Kap.3.11) geschlossen werden konnte.

Die Messungen erfolgten im 1 ml Ansatz in Plastikküvetten (Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) mit einer Schichtdicke von 1 cm und setzten sich wie folgt zusammen: 0,1 M Tris HCl pH 8,0; 10 mM MgCl₂; 0,5 mM ATP; 10 mM KHCO₃; 0,2 mM Phosphoenolpyruvat; 0,3 mg/ml NADH; 0,5 mg/ml BSA; 0,08 mg/ml Pyruvatkinase; 0,025 mg/ml Lactat-Dehydrogenase und 5-100 μ g Enzymlösung. Die Messung wurde durch die Zugabe von 1 mM Methylcrotonyl-CoA (MCoA) bzw. Geranyl-CoA (GCoA) gestartet und am Cary 100 Bio UV-Visible Spektrophotometer (Varian Deutschland GmbH, Darmstadt) verfolgt. Der für die Berechnungen der Enzymaktivitäten herangezogene Extinktionskoeffizient für NADH+H⁺ betrug $\varepsilon = 6,22$ cm⁻¹ mM⁻¹ (Horecker. & Kornberg, 1948; Trentham, 1968).

3.14.3. Messung der Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase

Die Anlagerung von Wasser an die Doppelbindung von α , β -ungesättigten Thioestern führt zum Verschwinden der charakteristischen Absorptionsbande (Maximum im Bereich 263-266 nm), welche diese Verbindungen aufweisen (Seubert & Fass, 1964a). Somit ermöglicht diese Eigenschaft des Isohexenyl-glutaconyl-CoAs eine einfache optische Aktivitätsbestimmung der Hydratase.

Für die Messung der Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase Aktivität wurde der Assay nach Seubert & Fass (1964a) etwas modifiziert. Zur Berechnung des Substanzumsatzes kam bei den Autoren der Extinktionskoeffizient für Dimethylacryl-CoA von $\varepsilon = 5.2 \times 10^3 \text{ mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$ zur Anwendung.

3.14.3.1. Kopplung von GCase und Hydratase

Zunächst wurde der Ansatz des Geranyl-CoA Carboxylase Assays zusammenpipettiert und mit GCoA, wie bereits im Abschnitt 3.14.2. beschrieben, gestartet. Nach einer Inkubation des Ansatzes für 15 min erfolgte die Zugabe der Hydratase, welche das durch die GCase theoretisch gebildete Isohexenyl-glutaconyl-CoA (IHG-CoA) weiter umsetzen sollte. Die

Messung wurde in einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 285 nm (30 °C) verfolgt, da aufgrund der hohen Lichtabsorption der Reaktionsansätze durch das zugesetzte ATP im Bereich von 260 nm die Messung im Absorptionsmaximum des Isohexenyl-glutaconyl-CoA (267 nm) nicht möglich ist (Seubert & Fass, 1964a).

3.14.3.2. Messung der Hydratase

Isohexenyl-glutaconyl-CoA (IHG-CoA) stand aufgrund der chemischen Arbeiten am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart zur Verfügung. Somit konnte dies als Substrat direkt in den Hydratase-Assay eingesetzt werden.

Der 0,5 ml Ansatz enthielt in einer Quarzküvette zunächst 0,1 M Tris HCl pH 8,0; 10 mM MgCl₂; 0,5 mM ATP; 10 mM KHCO₃; 0,5 mg/ml BSA und 0,1 mM IHG-CoA als Substrat. Die Reaktion wurde durch Zugabe der Hydratase (ca. 15-80 μ g) gestartet und bei 285 nm und einer Temperatur von 30 °C verfolgt.

3.14.3.3. Messung der Hydratase analog zu Feil (2006, modifiziert)

In der Arbeit von Feil (2006) wurde die Aktivität der (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase bestimmt. Dabei enthielt der Testansatz neben dem Protein lediglich das Substrat in 50 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6,2.

In weiteren Versuchen mit der Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase wurden somit 50 mM Kaliumphosphat Puffer und Tris HCl Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten (7; 7,5 und 8,0) getestet. Das Substrat Isohexenyl-glutaconyl-CoA wurde in Puffer gelöst (0,1 mM) und die Reaktion durch Zugabe der Hydratase gestartet. Die Reaktion wurde an dieser Stelle bei einer Wellenlänge von 267 nm (30 °C) verfolgt.

3.14.4 Messung der Hexokinase Reaktion

Für den Nachweis der Konzentrationsänderung von ATP und ADP mittels HPLC Analytik wurde aufgrund der relativ teuren CoA-Ester Substrate der Carboxylase Reaktionen zunächst eine einfachere Reaktion zur Etablierung der Methode nötig. Hierfür bot sich die Reaktion der Hexokinase an, welche mit Hilfe eines Enzym Assays der Fima Boehringer (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co.KG, Ingelheim am Rhein, Enzymkit) untersucht werden konnte. In diesem wird die Reaktion der Hexokinase, welche Glukose und ATP zu Glukose6-phosphat und ADP umsetzt mit einer Dehydrogenase Reaktion gekoppelt. Da in dieser Reaktion das Glukose-6-phosphat mit NADP zu Gluconat-6-phosphat und NADPH+H⁺ reagiert, kann aufgrund der Abnahme der NADP Konzentration die Reaktion am Photometer bei 340 nm verfolgt werden. Die Messung der Aktivität erfolgt gewöhnlich mit 0,22 M Glukose in 0,1 M Triethanolamin-Puffer pH 7,6 bei 25 °C. Des Weiteren im Reaktionsansatz enthalten sind 6,5 mM MgCl₂, 2,7 mM ATP, 0,83 mM NADP, 1,7 U Glukose-6-phosphat Dehydrogenase und Hexokinase. Für die Rektion in dieser Arbeit wurde der Reaktionspuffer der Carboxylase Reaktion (0,1 M Tris HCl, pH 8,0) als Puffer getestet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,22 mM Glukose gestartet und bei 340 nm am Photometer verfolgt.

3.14.5. Berechnung der spezifischen Enzym-Aktivität

Die Berechnung der Aktivität erfolgte nach folgenden Gleichungen:

$$A_{vol} = \frac{\Delta E \times V}{\Delta t \times v \times \varepsilon \times d}$$
$$A_{spz} = \frac{A_{vol}}{c}$$

A _{Vol} :	Volumenaktivität	$[mM/min] = [\mu mol/min \times ml]$
		= [U/ml]
A _{spz} :	spezifische Aktivität	[U/mg]
V:	Gesamtvolumen des Ansatzes	[ml]
υ:	Volumen der eingesetzten Proteinlösung	[ml]
d:	Schichtdicke der Küvette	[cm]
:3	molarer Extinktionskoeffizient	$[l/cm \times mM]$
c:	Proteinkonzentration	[mg/ml]

Die Enzymeinheit (U) wird definiert als die Aktivität, die den Umsatz von 1 μ mol Substrat bzw. die Bildung von 1 μ mol Produkt in einer Minute katalysiert. Die spezifische Aktivität wird in Einheiten pro Milligramm Protein angegeben. 1 Unit entspricht somit der Reaktion von 1 μ mol CoA-Ester pro Minute.

3.15. Chemikalien

Für die Versuche wurden die benötigten Chemikalien, falls nicht gesondert vermerkt, von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt), Fluka (Buchs, Schweiz), Gerbu (Gailberg), Merck (Darmstadt), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Taufkirchen) bezogen.

3.16. Chemische Methoden

3.16.1 Analytik

Die NMR-Spektren wurden an den Geräten Avance DPX 250 [250.13 MHz (¹H) und 62.77 MHz (¹³C)], Avance 300 [300.13 MHz (¹H) und 75.47 MHz (¹³C)], Avance 500 [500.13 MHz (¹H) und 125.77 MHz (¹³C)] der Firma Bruker (Bruker Daltonik GmbH, Bremen) aufgenommen. Die chemischen Verschiebungen der Signale sind in ppm angegeben und beziehen sich entweder auf Tetramethylsilan als externen Standard ($\delta = 0$ ppm) oder auf das verwendete Lösungsmittel, das jeweils in Klammern angegeben ist. Die Angaben bezüglich der Signale bedeuten:

```
s (Singulett), d (Dublett), t (Triplett), q (Quartett), m (Multiplett)
```

Für die Aufnahme der Infrarot-Spekten (IR) wurde ein Spektrometer vom Typ Bruker IFS 66 sowie ein Vector 22 *FT-IR* Spektrometer (beide Bruker Daltonik GmbH, Bremen) verwendet. Die Proben wurden entweder als Kaliumbromid-Pressling oder als Flüssigkeitsfilm zwischen Natriumchlorid-Platten vermessen. Die Messwerte sind in reziproken Wellenlängen (cm⁻¹) angegeben. Die Angaben zur Bandenintensität bedeuten:

br = breit, s = stark, m = mittelstark, w = schwach

Für die GC/MS Analytik wurden ein Trace 2000 GC mit Best PTV-Injektor mit Autosampler AS 2000 (Säule 30 m × 0,25 mm ID, Film: DB 5 MS (0,25 μ m)) und ein Einfach-Quadrupolmassenspektrometer Finnigan Trace MS für die Massenspektrometrie-Kopplung (Thermo Finnigan, Egelsbach) oder ein Gaschromatograph der Firma Hewlett Packard 5890 Series II (Trägergas: He, Säule:HP-5MS, 30 m × 0,25 mm ID, Phasendicke 0,25 μ m), gekoppelt an einen massenselektiven Detektor der Firma Finnigan Mat (Modell MAT 95) verwendet. Des Weiteren stand ein Gaschromatograph der Firma Agilent 6890 (Trägergas: He) an einen massenselektiven Detektor gekoppelt zur Verfügung. Die hochaufgelösten Massenspektren wurden an einem Spektrometer des Typs micro-TOF-Q (ESI) der Firma Bruker (Bruker Daltonik GmbH, Bremen), einem TSQ 7000 mit ESI 2-Quelle (Fa. Finnigan Mat) oder mit einem Spektrometer der Firma Joel vom Typ JMS-SX-102A aufgenommen.

Die Kapillargaschromatographie wurde an einem Focus GC der Firma Thermo Finnigan (Trägergas: H₂, Säule: DB1, 25 m Länge, 0,2 µm Phasendicke) durchgeführt. Zu vermessende Reinproben wurden mit Diethylether verdünnt. Reaktionsgemische wurden zuvor über eine kurze Kieselgelsäule (Laufmittel: Diethylether oder Ethylacetat) gereinigt. Die gaschromatographische Bestimmung des Reaktionsansatzes erfolgte durch Integration der entsprechenden Signale.

3.16.2 Chromatographie

Säulenchromatographische Trennungen wurden mit Kieselgel 60 (70-230 mesh) der Firma Merck (Darmstadt) durchgeführt. Für die analytische Dünnschichtchromatographie standen DC-Alufolien (Kieselgel 60, F_{254}) der Firma Merck (Darmstadt) zur Verfügung. Die Chromatogramme wurden mit folgenden Reagenzien entwickelt:

a) Cer(IV)-sulfat-Reagenz:	25 g Molybdänsäure (MoO ₃ × H ₂ O)
	10 g Cer(IV)sulfat (Ce(SO ₄) ₂)
	60 ml konz. Schwefelsäure
	940 ml demineralisiertes Wasser

Die Chemikalien ergeben ein Reagenz, das bei Entwicklung mit dem Heißluftfön blaue Flecken auf dem Chromatogramm entstehen lässt.

b) Kaliumpermanganat-Reagenz:	2 %-ige Kaliumpermanganat (KMNO ₄)-Lösung
	in 0,2 M Schwefelsäure

Nach dem Eintauchen der DC-Folie in die Reagenzlösung und anschließendem Wässern erscheinen die Substanzen als braune Flecken.

c) Anisaldehyd-Reagenz:

0,5 ml Anisaldehyd 10 ml Essigsäure 85% 5 ml H₂SO₄ 98% ad 100 ml Methanol

Das Reagenz bewirkt die Bildung von Flecken auf dem Chromatogramm nach Entwicklung mit dem Heißluftfön.

Für die Trennungen über semi-präparative Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) stand eine Pumpe K-501 und ein RI-Detektor K-2400 der Firma Knauer (Knauer Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. Herbert Knauer GmbH, Berlin) zur Verfügung. Die verwendeten Säulen waren vom Typ Nucleosil 100-10 (20 mm \times 250 mm) und Eurospher 100-55 (8 mm \times 250 mm).

3.16.3 Reagenzien und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien wurden bei den Firmen Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Fluka (Buchs, Schweiz), Acros (Thermo Fisher Scientific, Geel, Belgium) und Alfa Aesar (Alfa Aesar GmbH & Co KG A Johnson Matthey Company, Karlsruhe) bezogen und ohne weitere Reinigung eingesetzt.

Sämtliche Lösungsmittel, mit Ausnahme von Diethylether, wurden vor Gebrauch destilliert. Tetrahydrofuran, sowie Methyl-*tert*-butylether wurden über Natrium mit Benzophenon als Indikator von Wasserspuren befreit (Destillation). Toluol, Dichlormethan und Diethylether wurden über Calciumhydrid getrocknet, Methanol über Magnesium. Ethanol wurde über Natrium absolutiert.

Die Lösungsmittel für die Säulenchromatographie wurden ebenfalls durch Destillation gereinigt. Alle Laufmittelzusammensetzungen stellen Volumenverhältnisse dar.

4. Ergebnisse

4.1. Isolierung der Wildtyp-Carboxylasen aus P. aeruginosa und P. citronellolis

Die Verwertung von linearen Terpenoiden in *P. aeruginosa* und *P. citronellolis* erfolgt über einen induzierbaren Abbauweg. Während eines Wachstums der Organismen auf Substraten ohne Bezug zu Terpenen wie z.B. Glukose oder Fettsäuren, aber auch auf Substraten des Liu (*leucine/isovalerate utilisation*) Weges wie z.B. Leucin oder Isovaleriansäure erfolgt keine Expression der Gene des Atu (*acyclic terpene utilisation*) Weges. Proteine des Atu Abbauweges können lediglich in Zellen nachgewiesen werden, welche auf azyklischen Monoterpenen, wie z.B. Citronellol, Geraniol bzw. deren korrespondierenden Terpenaldehyden Citronellal und Geranial oder auch den entsprechenden Säuren Citronellsäure und Geranylsäure als C- und Energiequelle angezogen wurden (Förster-Fromme & Jendrossek, 2006). Der Nachweis der Expression der so induzierten Gene erfolgt über die Carboxylasen des Atu- und Liu-Weges (Geranyl-CoA Carboxylase [GCase], Metylcrotonyl-CoA Carboxylase [MCase]), welche aufgrund einer Biotin-haltigen Untereinheit relativ einfach nachgewiesen werden können (Höschle et *al.*, 2005).

Für die Gewinnung der Wildtyp-Carboxylasen aus *P. aeruginosa* bzw. *P. citronellolis* für weiterführende Untersuchungen wurden die Stämme in Mineralmedium mit Isovaleriansäure bzw. Citronellsäure als C-Quelle angezogen (Kap.3.9.1.). Als Kontrolle erfolgte die Anzucht der Stämme in Mineralmedium mit Glukose als C-Quelle. Die Kulturen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase durch Zentrifugation geerntet und im folgenden Verlauf der Arbeiten mittels French-Presse (Kap.3.9.2.) aufgeschlossen. Die Aufreinigung der Biotinhaltigen Carboxylasen aus den löslichen Zellextrakten erfolgte über Affinitätschromatographie mit Hilfe des Säulenmaterials ImmunoPure[®] Immobilized Monomeric Avidin Gel (PIERCE, Rockford, USA) wie im Abschnitt 3.9.3. beschrieben. Die Ergebnisse der Aufreinigung, welche mittels SDS-PAGE (Kap.3.8.2.) kontrolliert wurde, sind in der Abbildung 4.1 dargestellt. Dabei war ersichtlich, dass eine partielle Aufreinigung der Biotinhaltigen Proteine über das gewählte Säulenmaterial möglich war.



Abb. 4.1: Aufreinigung der verschiedenen Rohextrakte von *P. aeruginosa* über monomeres Avidin Gel Jeweils 10 µl der Proben wurden über ein 12 %iges SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie

gefärbt. Gezeigt sind die Ergebnisse der [A] Reinigung des Rohextraktes gewonnen aus Zellen gewachsen auf Glukose, [B] Reinigung des Rohextraktes gewonnen aus Zellen gewachsen auf Isovaleriansäure und in [C] Reinigung des Rohextraktes gewonnen aus Zellen gewachsen auf Citronellsäure als C- und Energiequelle. M: Marker; RE: Rohextrakt; W: Waschfraktion; E: Elutionsfraktion

Verglich man die einzelnen Protein-haltigen Fraktionen miteinander (Abb. 4.2) so konnten die Unterschiede zwischen den einzelnen Anzuchtsbedingungen deutlich festgestellt werden. Im Vergleich zu Zellen, die auf Glukose im Medium angezogen wurden (Abb. 4.2, Spur 1, 2 Banden), waren bei Verwendung von Isovaleriansäure als C-Quelle zwei zusätzliche Banden im Gel zu erkennen (Abb. 4.2, Spur 2). Bei Wachstum auf Citronellsäure als C-Quelle konnten zusätzlich 3 Banden im Vergleich zu auf Glukose gewachsenen Zellen festgestellt werden (Abb. 4.2, Spur 3). In früheren Arbeiten (Höschle et *al.*, 2005) wurde gezeigt, dass es sich bei der hier mit "4-5" markierten Bande um eine Doppelbande handelte, welche sich jedoch unter den gegebenen Bedingungen nicht gut sichtbar auftrennen lässt. Ferner konnte in der Arbeit von Höschle et *al.* (2005) eine Zuordnung der Proteine zu den entsprechenden Banden im SDS-Gel erfolgen. Diese Zuordnung ist in der Abb. 4.2 angegeben. Infolgedessen konte gezeigt werden, dass in Glukose gewachsenen Zellen nur ein Biotin-haltiges Protein, dessen kodierende Sequenzen konstitutiv exprimiert wurden, nachweisbar ist. Dieses Protein (putative Acetyl-CoA Carboxylase) ist dabei jedoch nicht an der Carboxylierung von Methylverzweigten Substanzen beteiligt (Höschle et *al.*, 2005). In mit Isovaleriansäure gewachsenen

Zellen konnte ein weiteres Protein, welches sich aus den beiden Untereinheiten LiuD und LiuB zusammensetzt, identifiziert werden. Diese beiden Untereinheiten bilden die Methylcrotonyl-CoA Carboxylase (Höschle et *al.*, 2005), deren Beteiligung am Leucin/Isovaleriansäure Abbau und deren spezifische Induktion durch Wachstum auf diesen Substanzen bereits gezeigt werden konnte (Hector & Fall, 1976a; Hector & Fall, 1976b; Fall & Hector, 1977). In mit Citronellsäure gewachsenen Zellen war im Vergleich dazu ein weiteres Biotin-haltiges Protein zu beobachten, welches sich aus den beiden Untereinheiten AtuF und AtuC zusammensetzt. Die so gebildete Geranyl-CoA Carboxylase wird lediglich in Zellen induziert, welche auf azyklischen Monoterpenen als C- und Energiequelle angezogen wurden (Förster-Fromme & Jendrossek, 2006). Bereits bekannte Ergebnisse konnten somit an dieser Stelle erfolgreich reproduziert werden.



Abb. 4.2: Vergleichende Darstellung der aufgereinigten Proteinfraktionen von unterschiedlich angezogenen *P. aeruginosa* Zellen. Die Zuordnung der Poteinbanden erfolgte dabei aufgrund der Ergebnisse in Höschle et al. (2005).
1: aufgereinigter Rohextrakt von auf Glukose gewachsenen Zellen, M: Marker, 2: aufgereinigter Rohextrakt von auf Isovaleriansäure gewachsenen Zellen und 3: aufgereinigter Rohextrakt von auf Citronellsäure gewachsenen Zellen

4.2. Versuche zur Bestimmung der Enzymaktivität von Wildtyp-Carboxylasen

Das Schlüsselenzym des Citronellolstoffwechsels, die Geranyl-CoA Carboxylase, wurde schon von Seubert und Mitarbeitern aus *P. citronellolis* aufgereinigt und näher charakterisiert (Seubert et *al.*, 1963). In diesen Arbeiten wurde festgestellt, dass das Enzym durch das Wachstum mit Citronellol als C-Quelle im Medium induziert wird und nur das *cis*-Geranyl-CoA als Substrat akzeptiert (Seubert et *al.*, 1963). Durch Höschle et *al.* (2005) konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass auch die Geranyl-CoA Carboxlase aus *P. aeruginosa* ein durch das Wachstum auf Isoprenoiden als C-Quelle induzierbares Enzym darstellt. Des Weiteren konnten durch Verwendung von Rohextrakten von *P. aeruginosa* PAO1 Zellen Carboxylase-Aktvitäten bestimmt werden (Förster-Fromme et *al.*, 2006). Diese lagen bei

Zellen, welche mit Citronellsäure gewachsen waren bei 15 mU/mg mit GCoA bzw. bei 33 mU/mg bei MCoA als Substrat. Wurden dagegen Zellen getestet, welche mit Isovaleriansäure als C-Quelle gewachsen waren, so konnte eine Aktivität von 45 mU/mg mit MCoA als Substrat, jedoch keine Akivität mit GCoA als Substrat erhalten werden (Tab. 4.1).

Stamm und C-Quelle	Spezifische Aktivität (mU/mg)		
	GCase	MCase	
⁷ P. aeruginosa PAO1,	<i>≤</i> 3	≤3	
Glukose			
¹ P. aeruginosa PAO1,	15	33	
Citronellsäure			
¹ P. aeruginosa PAO1,	≤ 3	45	
Isovaleriansäure			
² P. citronellolis,	≤2	nb	
Glukose			
² P. citronellolis,	28	nb	
Citronellsäure			
² <i>P. citronellolis</i> ,	≤2	nb	
Isovaleriansäure			

Tab. 4.1: Spezifische GCase und MCase Aktivitäten von löslichen Zellextrakten
(¹ Förster-Fromme et <i>al.</i> , 2006; ² Förster-Fromme, 2008)

^aAufgrund der vorliegenden NADH Oxidase Aktivitäten in den Stämmen kann eine signifikante Carboxylase Aktivität nur über 3 mU/mg bestimmt werden.

Legende: nb: Aktivität nicht bestimmt

In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls Bestimmungen zu den Aktivitäten der drei verschiedenen Zellextrakte durchgeführt. Hierfür wurden die *P. aeruginosa* PAO1 Zellen in Mineralmedium mit Glukose, Citronellsäure oder Isovaleriansäure als C-Quelle angezogen. Bei den verwendeten CoA-Estern Geranyl-CoA (GCoA) und Methylcrotonyl-CoA (MCoA) handelte es sich um Verbindungen, welche nach der Methode des gemischten Anhydrids (Guan et *al.*, 1999; Förster-Fromme et *al.*, 2006, Kap.3.11.) aus Geranylsäure bzw. 3-Methyl-Crotonsäure als Ausgangsverbindungen selbst synthetisiert wurden. Lediglich vom MCoA stand auch eine kommerziell erhältliche Verbindung zur Verfügung. Durch eine erfolgreiche Reaktion mit diesem konnte somit das selbsthergestellte Substrat kontrolliert und bei Vergleich beider Substrate auf den Erfolg der Synthese geschlossen werden. Ein weiterer Vergleich von gekauftem und selbstsynthetisiertem MCoA war mittels HPLC-Analyse möglich (Kap.4.7.1.). Ferner wurden die Verbindungen über HPLC-(ESI)-MS Analyse

(Kap.3.13.) untersucht. Mittels dieser Methode konnten die selbstsynthetisierten Verbindungen über ihre Masse bestätigt werden (Tab. 4.2.).

Substanz	MS (ES') <i>m/z</i> (%)
CoenzymA (CoA)	766 (16), 686 (7), 631 (3), 419 (4), 413 (4), 383 (100), 357 (5), 315 (6), 255 (3), 245 (4)
Methylcrotonyl- CoA (MCoA)	848 (61), 768 (9), 713 (5), 453 (5), 424 (100), 408 (3), 383 (36), 356 (5), 315 (15), 282 (4), 243 (5)
Citronellyl-CoA (CCoA)	918 (49), 838 (8), 489 (4), 459 (100), 391 (6), 383 (10), 306 (3), 295 (4), 231 (4)
Geranyl-CoA (GCoA)	916 (21), 836 (5), 686 (4), 488 (3), 458 (100), 421 (5), 395 (9), 383 (92), 315 (14), 289 (4)

Tab. 4.2: Bestätigung der CoA-Ester Substrate über ihre Masse (HPLC-(ESI)-MS Analyse)

In den vorliegenden Messungen konnten für Zellen, welche mit Glukose als C-Quelle angezogen wurden, jeweils Aktivitäten von 7 mU/mg mit GCoA und MCoA als Substrate erzielt werden. Da in mit Glukose gewachsenen Zellen weder der Citronellolstoffwechsel noch der Leucin Abbauweg aktiv ist, konnten diese Aktivitäten als Hintergrundreaktion angesehen werden. Mit Extrakten, bei denen durch Wachstum auf Citronellsäure der Atu- und der Liu-Weg induziert wurden, konnten Aktivitäten sowohl mit GCoA als auch mit MCoA beobachtet werden. Die GCase Aktivität dieser Extrakte lag bei 11 mU/mg und die MCase Aktivität bei 47 mU/mg. Vergleichend dazu lag die "GCase Aktivität" von Isovaleriansäure-Zellen bei 6 mU/mg und somit im Hintergrundbereich. Die MCase Aktivität dieser Zellen lag bei deutlichen 54 mU/mg. Die erhaltenen Daten (Tab. 4.3) waren somit vergleichbar mit den Ergebnissen, welche schon zuvor in der Arbeitsgruppe Jendrossek erhalten werden konnten (Tab. 4.1).

Spezifische Aktivität (mU/mg)		
GCase	MCase	
7 ± 4^1	7 ± 4^2	
11 ± 6^{3}	47 ± 11^4	
6 ± 2^5	54 ± 22^6	
	Spezifische GCase 7 ± 4^1 11 ± 6^3 6 ± 2^5	

Legende: ¹: 11 unabhängige Messungen, ²: 6 unabhängige Messungen, ³: 21 unabhängige Messungen, ⁴: 9 unabhängige Messungen, ⁵: 5 unabhangige Messungen und ⁶: 4 unabhangige Messungen

Im weiteren Verlauf wurden die löslichen Extrakte, gewonnen aus Zellen, welche mit unterschiedlichen C-Quellen angezogen wurden, über Avidin-Gel als Säulenmaterial partiell aufgereinigt (vgl. Abb. 4.1). Die erhaltenen Proteinfraktionen wurden aufgrund störender Effekte des Elutionspuffers in 100 mM Tris HCl pH 8,0 umgepuffert. Da über diese Aufreinigung auch nur sehr wenig Protein erhalten werden konnte, erfolgte zusätzlich ein Aufkonzentrieren entsprechender Lösungen mittels Vivaspin Zentrifugationskonzentrationseinheiten. Somit war es möglich partiell aufgereinigtes Protein für die weiteren Untersuchungen zu erhalten.



Abb. 4.3: Proteinhaltige Fraktionen aus *P. aeruginosa* nach Aufreinigung über Avidin-Gel, Umpufferung und anschließender Aufkonzentrierung
 Jeweils 10 μl der Proben wurden über ein 12 %iges SDS-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. M: Marker, 1: Protein aufgereinigt aus Rohextrakt von mit Glukose angezogenen Zellen (0,34 mg/ml), 2: Protein aufgereinigt aus Rohextrakt von mit Isovaleriansäure angezogenen Zellen (0,29 mg/ml) und 3: Protein aufgereinigt aus Rohextrakt von mit Citronellsäure angezogenen Zellen (0,24 mg/ml)

Wurden so aufgereinigte Proteine folgend in den Carboxylase Assay eingesetzt, so konnten für mit Glukose angezogenen Zellen und daraus resultierendes aufgereinigtes Protein keine Aktivitäten mit MCoA als auch mit GCoA bestimmt werden. Aus Isovaleriansäure Extrakten (Iso Rohextrakt) erhaltenes Protein zeigte im Assay keine Aktivität mit GCoA. Mit MCoA dagegen konnten Aktivitäten von 5800 mU/mg mit gekauftem MCoA und 4600 mU/mg mit selbstsynthetisierten MCoA erhalten werden. Bei der Verwendung von Protein, welches aus Citronellsäure Zellen (Cs Zellen) gewonnen wurde, wurden Aktivitäten von 2600 mU/mg mit gekauftem MCoA und 1900 mU/mg mit selbstsynthetisierten MCoA erreicht. Wurde GCoA als Substrat in den Assay eingesetzt, so konnte keine signifikante Absorptionsänderung beobachtet werden. Vereinzelt konnte jedoch eine "Aktivität" von um die 3,5 mU/mg berechnet werden. Da dieser Wert allerdings unter dem bestimmten Wert für Rohextrakt von *P. aeruginosa* PAO1 Glukose Zellen lag (7 mU/mg) und auch keine deutliche Änderung der Absorption zu beobachten war (Abb. 4.4), ist hier von keiner signifikanten Aktivität zu sprechen.

solierte Proteinfraktionen Spezifische Aktivität (mU/			/mg)
aus P. aeruginosa PAO1	GCase	MCase	
Rohextrakt			
	GCoA _{synth.}	MCoA _{synth.}	MCoA _{gek.}
Protein Glu (Glukose Zellen)	nn^1	nn ¹	nn ¹
Protein Cs (Citronellsäure Zellen)	$3,5 \pm 8^{3}$	1900 ± 1200^2	2600 ± 855^2
Protein Iso (Isovaleriansäure Zellen)	nn^1	4600 ± 966^1	5800 ± 550^4

Tab. 4.4: Spezifische GCase und MCase Aktivitäten von aufgereinigten Zellextrakten

Legende: nn: Aktivität nicht nachweisbar; ¹: 4 unabhängige Messungen, ²: 10 unabhängige Messungen, ³: \geq 10 unabhängige Messungen, ⁴: 2 unabhängige Messungen

An dieser Stelle konnten sowohl mit gekauftem als auch mit selbstsynthetisiertem MCoA Aktivitäten mit Proteinen aus Citronellsäure (Cs) und Isovaleriansäure (Iso) Zellen bestimmt werden. Dabei lagen die Aktivitäten mit gekauften MCoA als Substrat um das 1,3-fache höher als bei Einsatz von selbsthergestellem CoA-Ester. Da nach der Synthese die CoA-Ester nicht weiter aufgereinigt wurden, liegt die Vermutung nahe, dass die etwas geringeren Aktivitäten der Proben mit diesem Substrat auf noch enthaltenen Verunreinigungen zurückzuführen sind. Ein Fehler bei der chemischen Synthese konnte aufgrund dieser Ergebnisse jedoch ausgeschlossen werden. Eine GCase Aktivität war dennoch nicht zu beobachten.

In den folgenden Abbildungen sind zum besseren Verständnis charakteristische Carboxylase Assays graphisch dargestellt. In der Abb. 4.4 ist der Verlauf des Geranyl-CoA Carboxylase Assays gezeigt. Bei Einsatz von 10 μ l Protein aus Cs Zellen (Konz. 0,09 mg/ml) und 20 μ l GCoA (Konzentration im Ansatz: 1 mM) wird deutlich, das hier keine sinifikante Aktivität beobachtet werden konnte. Ein vergleichbarer Verlauf wurde auch für die Proteinfraktionen, welche aus Glukose Zellen aufgereinigt wurden, erhalten (Daten nicht gezeigt). Wurde der Ansatz mit 10 μ l Protein (Konz. der Proteinlösung 0,08 mg/ml) aufgereinigt aus Rohextrakt von Isovaleriansäure Zellen und MCoA (Konz. im Ansatz: 1 mM) angesetzt, so wurde der Verlauf, wie er in den Abb. 4.5 und 4.6 dargestellt ist, erhalten. Bei Verwendung von gekauftem MCoA konnte im Vergleich zum selbstsynthetisiertem MCoA eine lineare Reaktion über einen längeren Zeitraum (20 min) beobachtet werden (Abb. 4.5). Vergleichend dazu beginnt in der Abb. 4.6 der entsprechende Reaktionsverlauf bei Einsatz von selbstsynthetisiertem MCoA ab ca. 10 min leicht abzuflachen.



Abb. 4.4: Messung der GCase Aktivität von Protein aufgereinigt aus Citronellsäure Zellen des Stammes *P. aeruginosa* PAO1 Dargestellt ist ein Enzymassay mit 10 μl aufgereinigter Proteinlösung (0,09 mg/ml) im Ansatz. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 μl GCoA als Substart, wobei eine Änderung der Absorption im Vergleich zur Reaktion ohne GCoA (Hintergrund) hier jedoch nicht zu

beobachten ist.



Abb. 4.5: Messung der MCase Aktivität von Protein aufgereinigt aus Isovaleriansäure Zellen des Stammes *P. aeruginosa* PAO1

Dargestellt ist ein Enzymassay mit 10 µl aufgereinigter Proteinlösung (0,08 mg/ml) im Ansatz. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl MCoA (Sigma). Aus der zu beobachtenden Absorptionsänderung konnte eine Aktivität von 5400 mU/mg berechnet werden.



Abb. 4.6 Messung der MCase Aktivität von Protein aufgereinigt aus Isovaleriansäure Zellen des Stammes *P. aeruginosa* PAO1
 Dargestellt ist ein Enzymassay mit 10 μl aufgereinigter Proteinlösung (0,08 mg/ml) im Ansatz. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 μl MCoA (synthetisiert). Aus der hier zu beobachtenden Absorptionsänderung konnte eine Aktivität von 5900 mU/mg berechnet werden.

Obwohl beide Verbindungen, das Methylcrotonyl-CoA ebenso wie das Geranyl-CoA, über die gleiche Methode synthetisiert und die Assays unter gleichen Bedingungen durchgeführt wurden, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die fehlende Aktivität und damit die scheinbare Inaktivität des Enzyms aus *P. aeruginosa* mit Geranyl-CoA als Substrat durch eine zu geringe Konzentration des Enzyms, ein "falsches" Substrat oder durch das Fehlen einer wichtigen Komponente, welche bei der Aufreinigung verloren gegangen ist, bedingt sein könnte.

Dem möglichen Einfluss einer zu geringen Proteinkonzentration konnte durch Aufkonzentrierung der entsprechenden Proteinlösungen begegnet werden. Ungeachtet dessen waren bei Einsatz dieser Proteinproben (bis zu 100 µg im Ansatz) jedoch ebenfalls keine GCase Aktivitäten festzustellen. Eine Absorptionsänderung konnte auch bei diesen Ansätzen nicht beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Auch das mögliche Fehlen von zusätzlichen Faktoren, die für das Enzym und seine Funktion zwar essentiell sind, während der Aufreinigung des Rohextraktes aber durch Abwaschen von der Säule möglicherweise verloren gehen, wurde untersucht. In der Annahme also, das solche Faktoren im Rohextrakt zu finden sind, wurde aufgereinigte Geranyl-CoA Carboxylase (Protein Cs Zellen) mit Rohextrakt von P. aeruginosa (RE Cs) gemischt auf Eis inkubiert oder direkt im Assay eingesetzt. Weiterhin erfolgte die nacheinander folgende Zugabe von Rohextrakt und Proteinlösung. In all diesen Fällen konnte keine verstärkte Abnahme der Absorption bedingt durch die eingesetzte Proteinlösung festgestellt werden. Die Aktivitäten, welche erhalten werden konnten, entsprachen bei diesen Reaktionen den Aktivitäten, wie sie mit Rohextrakt von Cs Zellen allein erhalten wurden. Gleiche Experimente wurden mit Rohextrakt von mit Glukose gewachsenen Zellen durchgeführt (RE Glu). Eine Aktivität der aufgereinigten GCase konnte auch in diesen Versuchen nicht festgestellt werden. Somit war es nicht möglich die Aktivität der aufgereinigten Geranyl-CoA Carboxylase mit Hilfe von möglichen Faktoren im Rohextrakt von *P. aeruginosa* wieder herzustellen (Tab. 4.5). Aufgrund dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass die über die gleiche Methode aufgereinigte Methylcrotonyl-CoA Carboxylase aus *P. aeruginosa* aktiv ist, ist es unwahrscheinlich, dass die nicht vorhandene Aktivität der GCase auf das Fehlen von zusätzlichen Faktoren zurückzuführen ist.

 Tab. 4.5:
 Versuche zur Wiederherstellung der Aktivität der aufgereinigten Geranyl-CoA Carboxylase (Protein Cs Zellen) aus P. aeruginosa

Ansatz + Geranyl-CoA	Aktivität in mU/mg	Beobachtung im Verlauf des Carboxylase Assays		
1. Messung der Rohextrakte einzel	n mit anscl	hließender Zugabe der	Proteinlösung	
Rohextrakt Glukose Zellen (RE Glu)	6,0	+ Protein Cs Zellen	keine Zunahme der Absorptionsabnahme	
Rohextrakt Citronellsäure Zellen (RE Cs)	14,8	+ Protein Cs Zellen	keine Zunahme der Absorptionsabnahme	
2. Messung der Mischungen aus Rohextrakte und Proteinlösung				
RE Glu + Protein Cs Zellen	3,8			
(RE Cs + Protein Cs Zellen) _{Eis}	16,8			
(RE Cs + Protein Cs Zellen)	8,2			
3. Messung von Rohextrakt P. citronellolis und aufgereinigtem Protein aus P. aeruginosa				
Rohextrakt Citronellsäure Zellen (RE Pc Cs)	325	mU/ml		
RE Pc Cs + Protein Cs Zellen	237	mU/ml		

Um zu untersuchen, ob gegebenenfalls im Geranyl-CoA Substrat sich auf die Enzymaktivität auswirkende und somit störendende Komponenten vorhanden sind, wurden Reaktionen angesetzt, bei denen zunächst die Zugabe von GCoA als Substrat und folgend die Gabe von MCoA, mit welchem bereits Aktivitäten erhalten werden konnten, zum Ansatz erfolgte. Bei diesen Untersuchungen konnten, wie bereits zuvor keine Aktivitäten von aufgereinigtem Protein aus mit Citronellsäure gewachsenen Zellen mit GCoA beobachtet werden. Bei der sich anschließenden Zugabe von MCoA war es jedoch möglich Aktivitäten bis zu 1500 mU/mg zu erhalten (Abb. 4.7). Diese Aktivitäten lagen im Bereich der bereits erhaltenen Aktivitäten, wodurch ein negativer Einfluss vom GCoA und möglichen zusätzlich enthaltenen Komponenten zumindest für die MCase Aktivität zunächst ausgeschlossen wurde. In einer anderen Reaktion wurde nach der Zugabe von MCoA, wodurch eine entsprechende Absorptionsänderung beobachtet werden konnte, weiteres GCoA der Reaktion zugesetzt. Nach dieser Zugabe wurde der Verlauf der Reaktion jedoch in diesem Falle so beeinflusst, dass eine Verringerung der Absorptionsänderung und damit ein Abflachen der Reaktion zu beobachten war. Um auszuschließen, dass es sich bei diesen Ergebnissen um Auswirkungen bedingt durch Verwendung unterschiedlicher Chargen an Protein bzw. Substrat handelte, wurden beide Reaktionen entsprechend mit gleichen Proben wiederholt.



 Abb. 4.7: Messung der Aktivität von Protein aufgereinigt aus Citronellsäure Zellen des Stammes P. aeruginosa PAO1
 Dargestellt ist ein Enzymassay mit 20 µl aufgereinigter Proteinlösung (0,03 mg/ml) im Ansatz. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 µl GCoA (1 mM). Nachdem keine Reaktion mit diesem Substrat festgetellt werden konnte, wurden der Reaktion 20 µl MCoA (1 mM) zugesetzt. Aus der resultierenden Absorptionsänderung konnte eine Aktivität von 1500 mU/mg berechnet werden.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen festgehalten. Auch in der Abb. 4.8 ist deutlich zu erkennen, dass eine Aktivität mit GCoA (0,4 mM) mit aufgereinigten Protein aus Citronellsäure Zellen nicht erhalten werden konnte. Nach der zusätzlichen Zugabe von MCoA (0,4 mM) war eine Absorptionsänderung zu beobachten. An dieser Stelle konnte eine Aktivität von 450 mU/mg bestimmt werden. Wurden der Reaktion weitere 0,4 mM GCoA zugesetzt, so flachte die MCase-Reaktion ab und es konnte lediglich eine Aktivität von 150 mU/mg berechnet werden.



Abb. 4.8: Messung einer Aktivität von Protein aufgereinigt aus Citronellsäure Zellen des Stammes *P. aeruginosa* PAO1 mit den Substraten GCoA und MCoA
 Dargestellt ist ein Enzymassay mit 15 μl aufgereinigter Proteinlösung (0,2 mg/ml) im Ansatz. Gestartet wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,4 mM GCoA, wobei keine Reaktion mit diesem Substrat festgetellt werden konnte. Nach Zugabe von 0,4 mM MCoA konnte aus der entsprechenden Absorptionsänderung eine Aktivität von 450 mU/mg berechnet werden. Wurden dem Ansatz weitere 0,4 mM GCoA zugesetzt, so resultierte daraus eine abflachende MCase Reaktion und damit eine Aktivität von nur noch 150 mU/mg.

Wurde im Vergleich dazu die Reaktion zunächst mit der Zugabe von MCoA (0,4 mM) als Substrat gestartet, so konnte nun durch die erhaltene Absorptionsänderung eine Aktivität von 1500 mU/mg berechnet werden. Die Zugabe von GCoA resultierte in einem Abflachen der Reaktion und einer verringerten Aktivität. Diese betrug vergleichend zur Ausgangsaktivität nur noch lediglich 300 mU/mg (Abb. 4.9).



Abb. 4.9: Messung einer Aktivität von Protein aufgereinigt aus Citronellsäure Zellen des Stammes *P. aeruginosa* PAO1 mit den Substraten MCoA und GCoA Dargestellt ist ein Enzymassay mit 15 μl aufgereinigter Proteinlösung (0,2 mg/ml) im Ansatz. Durch Zugabe von 0,4 mM MCoA zum Reaktionsansatz konnte eine Reaktion beobachtet und eine Aktivität von 1500 mU/mg berechnet werden. Die Zugabe von 0,4 mM GCoA zu dieser Reaktion bedingte einen reduzierte Absorptionsänderung und damit eine verringerte MCase Aktivität von 300 mU/mg.

Durch diese Ergebnisse konnte nun nicht mehr ausgeschlossen werden, dass die Reaktion mit Methylcrotonyl-CoA durch die Anwesenheit von Geranyl-CoA, bzw. in der Probe enthaltene Substanzen in ihrem Reaktionsverlauf negativ beeinflusst wird. Die Synthese beider CoA-Ester erfolgte über die gleiche Methode. Es bleibt somit zu klären, ob die Beeinflussung der Reaktion durch zusätzlich in der Probe enthaltene Substanzen oder durch das GCoA selbst hervorgerufen wird. Weiterhin stellt sich die Frage, ob das eingesetzte GCoA diesen Einfluss auch auf die Reaktion der GCase besitzt und somit eine detektierbare Absorptionänderung verhindert.

Die synthetisierten Substrate Methylcrotonyl-CoA und Geranyl-CoA konnten bereits durch die HPLC-(ESI)-MS Analyse über ihre Masse bestätigt werden. Ein unerwünschtes und damit falsches Produkt der Synthese, als Ursache für die fehlende GCase Aktivität konnte daher ausgeschlossen werden. Für die Darstellung von Geranyl-CoA lag allerdings ein Isomerengemisch der Geranylsäure (Sigma) vor, da isomerenreine Substanzen zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht erhältlich sind. Nach der Synthese des CoA-Esters wird folglich ein Gemisch aus *cis* und *trans*-Geranyl-CoA erhalten. Da das *trans* Isomer in der größeren Menge im Gemisch anfällt, aber vermutlich lediglich das *cis* Isomer als Substrat umgesetzt wird (Seubert et *al.*, 1963), könnte dies eine Erklärung für das Fehlen der GCase Aktivität darstellen. Um dies näher zu untersuchen, wurden Versuche unternommen, eine Kopplung der vorgeschalteten AtuD Reaktion mit dem Carboxylase Assay zu erreichen. Da AtuD Citronellyl-CoA zu *cis*-Geranyl-CoA umsetzt, müsste somit das entsprechend richtige Substrat für die Geranyl-CoA Carboxylase zur Verfügung stehen.

Versuche mit Hilfe von AtuD, der Citronellyl-CoA Dehydrogenase (Förster-Fromme et *al.*, 2008), direkt *cis*-GCoA aus Citronellyl-CoA (CCoA) herzustellen und dieses im Assay einzusetzen, wurden durchgeführt. Hierfür wurde versucht die Enzymassays für AtuD und GCase zusammenzufügen. Da beide Assays in verschiedenen Puffersystemen durchgeführt werden, wurde zunächst getestet, ob der AtuD Assay auch im Tris HCl pH 8 Reaktionspuffer (anstatt Natriumphosphatpuffer pH 7) durchführbar ist. Da dies der Fall war (Daten nicht gezeigt), konnte mit dem Versuch der Kopplung beider Assays begonnen werden. Nach einer Vorinkubation von Rohextrakt *E. coli* JM109::PA2889 (Stammsammlung Nummer 3311, AtuD ohne *Tag*) mit CCoA im entsprechenden Assay Mix wurde die Reaktion der GCase durch Zugabe der Assaykomponenten gestartet. Dieser Versuch war allerdings nicht aussagekräftig, da auch ohne Zugabe der Geranyl-CoA Carboxylase eine Abnahme der Absorption, lediglich durch Zugabe des Carboxylase Reaktionsmixes erfolgte (Abb. 4.10). Ein Abfall der Absorption und damit ein NADH+H⁺ Umsatz konnte sowohl bei Anwesenheit der GCase Assay Enzyme (Abb. 4.10 [A]) als auch bei deren Abwesenheit (Abb. 4.10 [B]) beobachtet werden. Da im so "gekoppelten" Assay sowohl NADH+H⁺ als auch DCPIP_{ox} und

PMS gemeinsam im Ansatz vorliegen, kommt es zur Reduktion von DCPIP_{ox}, wobei NAD⁺ und DCPIP_{red} generiert werden. Durch die so bewirkte Konzentrationsabnahme an NADH+H⁺ ließe sich die Absorptionsabnahme ohne Zugabe der Carboxylase erklären, allerdings war die Beobachtung der Absorptionsabnahme unabhängig davon, ob PMS und DCPIP_{ox} im Assay vorlagen oder nicht (Daten nicht gezeigt). Daher läßt sich vermuten, dass weitere Faktoren eine Rolle spielen. Eine mögliche Erklärung könnten weitere Dehydrogenasen darstellen, welche durch die Verwendung des *E. coli* Rohextraktes als Quelle des AtuDs ebenfalls im Ansatz enthalten sein müßten.

Eine Aussage über die Möglichkeit der Verknüpfung beider Enzymreaktionen und zur Aktivität der GCase aus *P. aeruginosa* konnte an dieser Stelle somit nicht gemacht werden.



Abb. 4.10:Darstellung des Versuchs eines gekoppelten Dehydrogenase-Carboxylase-AssaysIn [A] erfolgte nach Vorinkubation des AtuD-Assays die Zugabe der Carboxylase-Komponenten,
mit Reaktionsmix, PK/LDH und GCase Enzym. In [B] ist der gleiche Ansatz jedoch ohne
Zugabe des GCase Enzyms dargestellt. (PK: Pyruvat-Kinase, LDH: Lactat-Dehydrogenase)

Die Versuche zur Kopplung beider Enzymreaktionen wurden im weiteren Verlauf dieser Arbeit auch mit rekombinanten und aufgereinigtem Enzymen aus *E. coli* wiederholt. Diese Arbeiten werden im Abschnitt 4.4.3. besprochen.

Um auszuschließen, dass die fehlende GCase Aktivität auf die Verwendung des Isomerengemisches als Substrat zurückzuführen ist, ist eine Trennung beider Isomere erforderlich. Diese erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt der Arbeit (Kap.4.8.5.). Die Ergebnisse der entsprechenden Untersuchungen sind im Abschnitt 4.4.4. dargestellt.

Ähnliche Untersuchungen, wie zuvor für *P. aeruginosa* beschrieben, wurden auch mit *P. citronellolis* durchgeführt (Tab. 4.6). Dazu erfolgte die Anzucht dieses Stammes mit den drei verschieden C-Quelle Glukose, Citronellsäure und Isovaleriansäure. Entsprechende Rohextrakte sowie die daraus partiell aufgereinigten Proteinlösungen wurden als Enzymquelle in den Carboxylase Assay eingesetzt. Während mit Rohextrakt aus Glukose

Zellen weder Aktivitäten mit GCoA noch mit MCoA festgestellt werden konnten, war es bei der Verwendung der Rohextrakte aus Citronellsäure und Isovaleriansäure Zellen möglich aus den resultieren Absorptionsänderungen Aktivitäten mit MCoA als Substrat zu berechnen. Die Aktivität lag für Citronellsäure Zellen (RE Cs) bei 51 mU/mg und für Isovaleriansäure Zellen (RE Iso) bei 40 mU/mg. Eine GCase Aktivität der beiden Rohextrakte konnte vergleichend dazu nicht festgestellt werden. Nach einer partiellen Aufreinigung der Rohextrakte über Säulenchromatographie mittels Avidin-Gel konnten im Assay keine zufriedenstellenden Ergebnisse erhalten werden. Bei der Verwendung der Proteinlösungen aus Glukose und Citronellsäure Zellen war es nicht möglich Aktivität der Proteinlösung aufgereinigt aus Isovaleriansäure Zellen (Protein Iso) konnte bestimmt werden. Diese lag jedoch mit 41 mU/mg sehr deutlich unter der erhaltenen Aktivität mit entsprechenden Protein aus *P. aeruginosa* (4600 mU/mg).

Da es an diesem Punkt der Arbeit nicht möglich war eine GCase Aktivität mit Hilfe von aufgereinigtem Wildtypenzym zu erhalten, sollten im folgenden Verlauf die codierenden Sequenzen des Enzyms in *E. coli* kloniert und das auf diesem Wege rekombinant synthetisierte Enzym aufgereinigt werden.

	Spezifische Aktivität (mU/mg)	
	GCase	MCase
1. Messung der Rohextrakte		
Rohextrakt Glukose Zellen (RE Glu)	nn	nn
Rohextrakt Citronellsäure Zellen(RE Cs)	nn	51 ± 24
Rohextrakt Isovaleriansäure Zellen(RE Iso)	nn	40 ± 13
2. Messung der Proteinlösung		
Protein Glu Zellen	nn	nn
Protein Cs Zellen	nn	nn
Protein Iso Zellen	nn	41 ± 26

 Tab. 4.6:
 Versuche zur Aktivitätsbestimmung von Rohextrakt und aufgereinigten Proteinfraktionen aus P. citronellolis

Legende: nn: Aktivität nicht nachweisbar

Die Ergebnisse stammen jeweils aus mindestens 2 unabhängigen Messungen.

4.3. Heterologe Expression der Carboxylasen aus P. aeruginosa in E. coli

Bei der Verwendung des Avidin-Gels in der Affinitätschromatographie zur Aufreinigung der Wildtyp-Carboxylasen über die jeweilige Biotin-haltige Untereinheit konnte nur sehr wenig und auch nur partiell aufgereinigtes Protein erhalten werden. Des Weiteren war es für die so erhaltene Geranyl-CoA Carboxylase (GCase) nicht möglich eine Aktivität mit dem eingesetzten Substrat Geranyl-CoA (GCoA) zu bestimmen. Für die weitere Untersuchung des Abbauweges von der Geranyl-CoA Carboxylase über die Hydratase bis zur Lyase war die Geranyl-CoA Carboxylase als Schlüsselenzym essentiell. Da auf dem Wege der Isolierung aus dem Wildtyp aber kein aktives Enzym zur Verfügung stand, mussten andere Wege zur Gewinnung von Enzym gefunden werden.

4.3.1. Klonierung der codierenden Sequenzen der Carboxylase-Untereinheiten unter Verwendung des Vektorsystems pJoe4036.1

Da durch den Einsatz des Expressionsvektors pJoe4036.1 bei diversen Proteinen gute Ergebnisse hinsichtlich der Expression und Synthese an rekombinantem Protein erzielt werden konnten, sollte dieses System auch an dieser Stelle zur Anwendung kommen.

Die beiden Gene *atuC* und *atuF*, welche die beiden Untereinheiten der Geranyl-CoA Carboxylase codieren, sollten aufgrund ihrer Position zueinander im Gencluster (Abb. 4.11) zunächst separat amplifiziert und im weiteren Verlauf über eine gemeinsame Schnittstelle (hier: *Xba*I) ligiert werden (Abb. 4.12).



Abb. 4.11: Schematische Darstellung des *atu*-Genclusters in *P. aeruginosa* PAO1 Dargestellt sind die relativen Positionen der Gene des *atu*-Clusters in diesem Stamm. Pfeile für die PCR 1 und 2 stellen die zu amplifizierenden Genfragmente zur Klonierung der Geranyl-CoA Carboxylase dar.

Für die Klonierung des *atuC-atuF* Konstruktes in den Vektor pJoe4036.1 wurde der Primer "*atuC*_ExpGCase_upper" mit einer *Nde*I- und der Primer "*atuF*_ExpGCase_lower" mit einer *Bam*HI Schnittstelle versehen. Für die spätere Ligation der resultierenden *atuC* und *atuF* Fragmente zum *atuC-atuF_{His}* Konstrukt wurde den Primern "*atuC*_ExpGCase_lower" und "*atuF*_ExpGCase_upper" eine zusätzliche *Xba*I Schnittstelle angehängt. Diese beiden Primer wurden dabei so gewählt, dass ein Teil der intergenischen Region bestehen blieb (Abb. 4.12, blaue Sequenzbereiche). Eine putative Ribosomenbindestelle *upstream* vom *atuF*, welche theoretisch bis zu 20 bp vor dem eigentlichen Startcodon ATG zu finden ist (AGGA, grün unterlegt), wurde somit mit berücksichtigt und über die PCR-Reaktion mit amplifiziert.



BamHI

Abb. 4.12: Schematische Darstellung der Klonierung von *atuC* und *atuF* und daran beteiligte Schnittstellen

Die Sequenzen von *atuC* und *atuF* sind verkürzt in schwarz, die amplifizierten Intergenischen Bereiche zwischen *atuC* und *atuD* bzw. *atuE* und *atuF* in blau sowie Start- bzw. Stopcodon der Gene in rot dargestellt. Im oberen Bereich der Abbildung sind weiterhin schematisch die Primer und die Region ihrer Bindung festgehalten (nähere Erläuterungen im Text). Die verwendeten Schnittstellen sind im oberen Teil als Bestandteil der Primer genannt, im unteren Teil grün und unterstrichen markiert. Grün unterlegt ist die putative Ribosomenbindestelle (RBS) *upstream* von *atuF*. Für die Klonierung in den Vektor pJoe4036.1 ist der Verdau mit den Enzymen *Nde*I und *Bam*HI noch erforderlich.



Abb. 4.13: Vektorkarte des Konstruktes pJoe4036.1::*atuCF*_{His} Nähere Erläuterungen zur Klonierung sind im Text nachzulesen.

Da nicht sichergestellt werden konnte, dass die erfolgreiche Klonierung auch aktives rekombinantes Enzym hervorbringen würde, war aufgrund einer möglichen fehlenden Aktivität eine Kontrolle nötig. Mit der MCase konnten sowohl aus dem Rohextrakt von *P. aeruginosa* als auch mit dem über Avidin-Gel aufgereinigten Proteingemisch Aktivitäten mit MCoA als Substrat bestimmt werden. Aufgrund besagter Aktivitäten sollte es möglich sein, die heterologe Expression und die Synthese des gewünschten Proteins in *E. coli* bzw. dessen Aktivität über den Enzymassay mit MCoA als Substrat zu kontrollieren.

Die beiden Gene *liuB* und *liuD*, welche die Untereinheiten der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase codieren, werden wie in Abb. 4.14 ersichtlich lediglich durch das Gen *liuC* getrennt. Es bestand somit die Möglichkeit, wie bei den Untereinheiten der GCase beide Gene separat oder gemeinsam mit dem *liuC* Gen zu amplifizieren. Da sich bei der genaueren Betrachtung herausstellte, dass sich *liuC* und *liuD* in der Sequenz des Stop- bzw. Startcodons überlappen, sollten die Gene der Einfachheit halber zunächst gemeinsam amplifiziert werden (Abb. 4.15).



Abb. 4.14: Schematische Darstellung des *liu*-Genclusters in *P. aeruginosa* PAO1 Dargestellt sind die relativen Positionen der Gene des *liu* Clusters in diesem Stamm. Der Pfeil stellt das durch PCR zu amplifizierende Genfragment *liuB-liuC-liuD* dar (*liuBCD*).

Für die Amplifizierung des Konstruktes *liuB-liuC-liuD* (*liuBCD*) aus *P. aeruginosa* wurden die Primer ExpMCase_upper und ExpMCase_lower entsprechend abgeleitet und für die Klonierung eine *Nde*I Schnittstelle *upstream* vom *liuB* (Primer: ExpMCase_upper) bzw. einer *Bam*HI Schnittstelle *downstream* vom *liuD* (Primer: ExpMCase_lower) integriert. Da eine weitere Erkennungssequenz für das Enzym *Bam*HI in der *liuB* Sequenz (Position 1037 bp) zufinden war, musste darauf geachtet werden, das richtige Fragment nach dem Verdau zu isolieren. Nach Ligation mit dem Vektor pJoe4036.1 stand das Konstrukt mit einem C-terminalem His-*Tag* fusioniert (*liuBCD*_{His}) zur Verfügung (Abb. 4.16).

NdeI



BamHI

Abb. 4.15: Schematische Darstellung der genetischen Situation im Bereich liuB bis liuD

Die Sequenzen der Gene *liuB*, *liuC* und *liuD* sind verkürzt in schwarz, die Intergenische Region zwischen *liuB* und *liuC* in blau, sowie Start- bzw. Stopcodon der Gene in rot dargestellt. In der Abbildung sind weiterhin schematisch die Primer, ihre Schnittstellen und die Region ihrer Bindung festgehalten (nähere Erläuterungen im Text). Für die Klonierung in den Vektor pJoe4036.1 ist der Verdau mit den Enzymen *NdeI* und *Bam*HI noch erforderlich.



Abb. 4.16:Vektorkarte des Konstruktes pJoe4036.1::*liuBCD*_{His}
Nähere Erläuterungen zur Klonierung sind im Text nachzulesen.

Die Genfragmente wurden aus *P. aeruginosa* mit Hilfe der PrimeSTARTMHS DNA Polymerase der Firma TaKaRa (Lonza) amplifiziert. Die Fragmente (Abb. 4.17) der entsprechenden Größe (*atuC*: 1656 bp; *atuF*: 2044 bp; *liuBCD*: 4401 bp) wurden aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Nach Verdau mit den Enzymen *Xba*I und *Bam*HI im Falle des Fragmentes *atuF*, *Xba*I und *Nde*I im Falle der Fragmentes *atuC* bzw. *Nde*I und *Bam*HI im Falle des Fragmentes *liuBCD* schloss sich erneut eine Aufreinigung an. Bei dem Fragment *liuBCD* konnte dabei nicht das richtige Produkt erhalten werden. Aufgrund einer zweiten *BamH*I- Schnittstelle im Fragment war ein partieller Verdau mit diesem Enzym nötig. Nach diesem konnte die Bande mit der richtiger Größe im Gel festgestellt und isoliert werden (Daten nicht gezeigt).



Abb. 4.17: Amplifizierung der GCase- Untereinheiten *atuF* und *atuC* bzw. des MCase-Fragmentes mit *liuBCD* mit Hilfe der PrimeSTAR[™]HS DNA Polymerase der Firma TaKaRa
[A]: Proben der PCR Reaktion; [B]: Proben nach der Aufreinigung der PCR Reaktion
M: Marker *Gene Ruler[™]* DNA *Ladder* Mix, 1: PCR *atuF*; 2: PCR *atuC*, 3: PCR *liuBCD*. Es wurde jeweils 1µl der Proben aufgetragen.

Nach Ligation von *atuF* mit *atuC* und folgend mit dem entsprechend verdauten Vektor pJoe4036.1 bzw. des Fragmentes *liuBCD* mit dem Vektor pJoe4036.1 erfolgte im Anschluss eine Transformation in den Stamm *E. coli* JM109. Diverse auf AIX-Platten (Amp, IPTG, X-Gal) gewachsene weiße Kandidaten, die scheinbar ein Plasmid-Konstrukt aufgenommen hatten, wurden über Kolonie-PCR getestet. Positive Kandidaten mit dem richtigen Konstrukten konnten jedoch zunächst nicht erhalten werden. Erst nach einigen Durchgängen verschiedener Ligations- und Transformationsansätze konnten für das *liuBCD* Konstrukt Klone erhalten werden, welche ein positives Signal in der Kolonie-PCR bewirkten (Abb. 4.18). Auch im sich anschließenden Testverdau und der vollständigen Sequenzierung dieser Konstrukte konnte das Ergebnis bestätigt werden. Somit standen zwei positive *E. coli* Klone mit dem rekombinanten *liuBCD* Konstrukt für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Für das Konstrukt der GCase konnten unter diesen Bedingungen keine positiven Ergebnisse erzielt werden (Daten nicht gezeigt).



Abb. 4.18: Testen von E. coli JM109 pJoe4036.1::liuBCD Transformanten mittels Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer ExpMCase_upper und ExpMCase_lower
M: Marker Gene Ruler[™] DNA Ladder Mix, 1-10: Klone 1/1-1/10, 11: positive Kontrolle chromosomale DNA von P. aeruginosa, 12: negative Kontrolle Wasser. Auf ein 1 %iges Agarosegel wurden jeweils 5µl der Proben aufgetragen. Das Fragment liuBCD kann lediglich in den Klonen Nr. 1/1, 1/2, 1/4, 1/5, 1/7 und 1/10 identifiziert werden.

Da im Falle des atuCF Konstruktes zunächst der Verdau der Einzelfragmente (atuC, atuF) mit NdeI/XbaI bzw. XbaI/BamHI erfolgte und im Anschluss erst eine Ligation über die gemeinsame Schnittstelle in Angriff genommen wurde, bestand hier die Möglichkeit der Bildung größerer Ligationsfragmente, die nicht dem gewünschten Produkt entsprachen. Um die Bildung unbrauchbarer Fragmente zu vermeiden, wurden die amplifizierten Sequenzen von atuC und atuF in einem neuen Ansatz zunächst mit XbaI geschnitten und folgend über diese gemeinsame Schnittstelle miteinander ligiert. Nach der Ligation erst erfolgte dann der Verdau mit den Enzymen NdeI und BamHI und die anschließende Ligation in den Vektor pJoe4036.1. Nach einigen Versuchen, in denen unterschiedliche Zusammensetzungen bei den einzelnen Ligations- und Verdauansätzen ausgetestet werden mussten, konnten auch für dieses Konstrukt nach Transformation in den Stamm E. coli JM109 positive Kandidaten auf AIX-Nähragarplatten festgestellt werden. Diese wurden im Folgenden über Testverdau und Kolonie-PCR (Abb. 4.19) kontrolliert. Mittels Kolonie-PCR konnte lange Zeit kein Signal für das Fragment atuCF erhalten werden. Daher wurde zunächst unter Verwendung der Klonierungsprimer versucht, die Genfragmente der Konstrukte einzeln in den Klonen nachzuweisen (Abb. 4.19 [A], [B]). Nachdem hier nun Signale erhalten werden konnten, wurden die entsprechenden Klone auch auf das gemeinsame Vorhandensein der Genfragmente hin untersucht (Abb. 4.19 [C]). Die zwei hier als positiv identifizierten Klone (Nr. 2, 5) konnten auch über eine vollständige Sequenzierung bestätigt werden.



Abb. 4.19: Testen von *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*atuCF* Transformanten mittels Kolonie-PCR unter Verwendung der Primer [A] *atuC_*ExpGCase_upper und *atuC_*ExpGCase_lower, [B] *atuF_*ExpGCase_upper und *atuF_*ExpGCase_lower bzw. [C] *atuC_*ExpGCase_upper und *atuF_*ExpGCase_lower

M: Marker *Gene Ruler*TM DNA *Ladder* Mix, 1-12: Klone 1-12, 13: positive Kontrolle chromosomale DNA von *P. aeruginosa*, 14: negative Kontrolle Wasser. Auf ein 1 % iges Agarosegel wurden jeweils 5μ l der Proben aufgetragen. Lediglich Klon Nr. 2 und 5 enthalten sowohl *atuC* als auch *atuF*.

4.3.2. Expression und Synthese von rekombinantem Enzym in E. coli

Die so erhaltenen positiven Klone *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*liuBCD*_{His} Nr. 2 und 4 (Vektorkarte Abb. 4.16) und *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*atuC*F Nr. 2 und 5 (Vektorkarte Abb. 4.13) wurden zunächst einer Testexpression unterzogen, um die Expressionsbedingungen für diese Konstrukte zu untersuchen. Die Anzucht der Kulturen erfolgte bei 30 und 37 °C in LB-

Medium. Bei einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 wurde die Expression mit 0,2 % Rhamnose induziert. Jede Stunde wurde zur Kontrolle der Expression eine Probe entnommen. Als Beispiel sind hier die Ergebnisse der Klone E. coli JM109 pJoe4036.1::liuBCD Nr.2 und E. coli JM109 pJoe4036.1::atuCF Nr.5 im Vergleich zum E. coli Stamm mit dem leeren Vektor dokumentiert (Abb. 4.20). Da der Temperaturunterschied keinen sichtbaren Einfluss auf die Expression zeigte (Daten nicht gezeigt), wurden folgende Anzuchten der Stämme bei 30 °C durchgeführt. In den Abbildungen der Testexpressionen (hier 30 °C, Abb. 4.20) konnte eine Synthese von rekombinanten Protein in den gentechnisch veränderten E. coli Stämmen beobachtet werden. Dies war im Stamm E. coli JM109 pJoe4036.1 nicht der Fall. Eine verstärkte Expression war bei beiden Konstrukten bereits ca. 3 Stunden nach der Induktion zu erkennen, wobei diese 6 Stunden nach Induktion am stärksten war. Im Stamm E. coli JM109 pJoe4036.1::liuBCD (Abb. 4.20 [B]) ist die Synthese an rekombinanten Protein dabei deutlich stärker ausgeprägt als bei den GCase Untereinheiten im Stamm E. coli JM109 pJoe4036.1::atuCF (Abb. 4.20 [C]). Nichtsdestotrotz, in beiden Fällen konnte lediglich die Zunahme der Synthese von einem Protein und damit jeweils nur einer Untereinheit der Carboxylasen festgestellt werden. Sowohl bei der GCase als auch bei der MCase handelte es sich dabei um die kleinere der beiden Untereinheiten, also AtuC und LiuB. Bei den Biotinhaltigen Untereinheiten AtuF und LiuD, welche bei diesen Konstrukten auch gleichzeitig den His-Tag tragen, konnte keine zunehmende Proteinsynthese im SDS-Gel festgestellt werden. Die Position von LiuC mit einer theoretischen Größe von ca. 29 kDa konnte lediglich über eine Größenbestimmung mittel R_f-Wert abgeschätzt werden (Kap.3.8.2.6.). Über diese Abschätzung ist jedoch lediglich eine leichte Zunahme bei Banden mit einer Größe von 36,1 und 25,5 kDa zu beobachten. Das LiuC des Konstruktes pJoe4036.1::*liuBCD* konnte somit im SDS-Gel nicht identifiziert werden.

Um auch die Bildung der Untereinheiten AtuF (GCase) und LiuD (MCase) in den Proben zu kontrollieren, war eine Western-Blot Analyse erforderlich. Die Identifizierung dieser Untereinheiten erfolgte über das Biotin, welches mittels Steptavidin-Antikörper-Konjugat nachgewiesen werden konnte. Das Ergebnis der Western-Blot Analyse ist in der Abbildung 4.21 dokumentiert. Im entsprechenden SDS-Gel (Abb. 4.21 [A]) konnten wie bereits zuvor beschrieben die beiden Untereinheiten LiuB und AtuC anhand ihrer Größe identifiziert werden. Auch bei diesem Ansatz war die Bandenintensität und somit das produzierte LiuB Protein der MCase deutlich stärker als die Untereinheit AtuC der GCase. Im parallel dazu durchgeführten Western-Blot mit sich anschließendem Nachweis der Biotin-haltigen
Untereinheiten, konnten auch LiuD und AtuF anhand ihrer Größe identifiziert werden (Abb. 4.21 [B]).



Abb. 4.20: Nachweis der rekombinanten Proteinuntereinheiten der Methylcrotonyl-CoA und der Geranyl-CoA Carboxylase in einer Testexpression mittels SDS-PAGE (12 %) und Coomassie-Färbung

Expression [A] des leeren Expressionsvektors pJoe4036.1, [B] des Konstruktes pJoe4036.1::*liuBCD* (MCase) und [C] des Konstruktes pJoe4036.1::*atuCF* (GCase) im Stamm *E. coli* JM109. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl Probe. vI: Proben vor Induktion, 1-3: Proben nach 1-3 h, M: Marker, 4-23: Proben nach 4-23 h





M:Marker, 1: *E. coli* pJoe4036.1 Rohextrakt, 2: *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*liuBCD* Klon2 und 3: *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*atuCF* Klon5. Es wurden jeweils 30µg Rohextrakt aufgetragen. Identifizierte Proteine sind mittels Pfeil markiert und benannt.

Es wurde gezeigt, dass jeweils beide Untereinheiten sowohl der MCase (LiuB und LiuD) als auch der GCase (AtuC und AtuF) in *E. coli* gebildet werden konnten. Dabei ist das zu

beobachtende Level der MCase Untereinheiten deutlich größer als das Level der Untereinheiten der GCase. Eine verstärkte Expression von *liuC* als Bestandteil des *liuBCD*-Konstruktes konnte nicht eindeutig gezeigt werden. Für einen Nachweis des Proteins wären an dieser Stelle spezifische Antikörper erforderlich gewesen.

Da jeweils beide Untereinheiten der Enzyme Methylcrotonyl-CoA und Geranyl-CoA Carboxylase identifiziert werden konnten, sollte im weiteren Verlauf dieser Arbeit die Aufreinigung der Proteine in Angriff genommen werden. Hierfür erfolgte zunächst eine größere Anzucht der Stämme unter den in den Testexpressionen erhaltenen Parametern. Die Zellen wurden somit bei 30 °C angezogen und nach der Induktion weitere 6 Stunden bis zur Zellernte inkubiert. Nach Aufschluss der geernteten Zellen wurde zunächst die Aufreinigung über die Biotin-haltige Untereinheit der Carboxylasen mittels Avidin-Gel Säulchen getestet (Abb. 4.22). Lediglich im Falle der MCase war an dieser Stelle eine partielle Aufreinigung möglich. Die Menge an so gewonnenem Protein war jedoch sehr gering (Abb. 4.22 [A]). Für die GCase Untereinheiten konnten lediglich Spuren an Protein in den Elutionsfraktionen festgestellt werden (Abb. 4.22 [B]). Im Vergleich zum MCase Rohextrakt, bei welchem beide Untereinheiten von der Säule eluiert wurden (Abb. 4.22 [A]: E2-E4), war es bei Verwendung von GCase Rohextrakt nicht möglich beide Proteinuntereinheiten in ausreichenden Mengen zu erhalten (Abb. 4.22. [B]). Hier konnte die größere Untereinheit in Spuren gewonnen werden, wohingegen die Menge der kleineren Untereinheit verschwindend gering war.



Abb. 4.22:Reinigung von rekombinanten Proteinen über monomeres Avidin. Zur Aufreinigung der
[A] MCase wurde Rohextrakt von E. coli JM109 pJoe4036.1::liuBCD Klon2 und [B] für die
GCase Rohextrakt von E. coli JM109 pJoe4036.1::atuCF Klon5 verwendet.
Jeweils 10 μl Probe wurden in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch
Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. RE: Rohextrakt, DF: Durchfluss, W1-6: Waschfraktionen,
M: Marker, E1-E5: Elutionsfraktionen

Weiterhin erfolgte die Reinigung der Rohextrakte (löslichen Bestandteile) über Ni-NTA Agarose Säulchen. Die Ergebnisse dieser Aufreinigung sind in den folgenden Abbildungen dargestellt. In der Abbildung 4.23 ist zu erkennen, dass eine Elution der Proteinuntereinheiten der MCase von der Säule mit 50 mM Imidazol im Puffer begann. Die größte Menge an Protein war jedoch in der Fraktion mit 100 mM Imidazol im Puffer enthalten (Spur: E3-4). In den Waschfraktionen W3/4 konnte im unteren Bereich des Gels eine weitere starke Proteinbande festgestellt werden. Nach Abschätzung des Molekulargewichts auf ca. 28,9 kDa könnte es sich in diesem Fall um das LiuC handeln.



Abb. 4.23 Reinigung von rekombinanten Protein aus dem Rohextrakt von E. coli JM109 pJoe4036.1::liuBCD Klon2 über Ni-NTA Agarose
Jeweils 10 μl Probe der einzelnen Fraktionen wurden in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. RE: Rohextrakt, DF: Durchfluss, W1-2: Waschfraktionen (10 mM Imidazol), M: Marker, 3-4: Waschfraktionen (20 mM Imidazol), E1-E2: Elutionsfraktionen mit 50 mM Imidazol, E3-4: Elutionsfraktionen mit 100 mM Imidazol, E5-6: Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol, E7-8: Elutionsfraktionen mit 200 mM Imidazol, E9-10: Elutionsfraktionen mit 250 mM Imidazol, E11-12: Elutionsfraktionen mit 500 mM Imidazol

Bei der Reinigung von *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*atuCF* Klon5 Rohextrakt war die Menge an eluierten Proteinen deutlich geringer. Die Elution der GCase-Untereinheiten erfolgte auch hier mit einer Imidazolkonzentration von 100 mM im Elutionspuffer (Abb. 4.24, Spur: E3-4). Im Vergleich zur versuchten Aufreinigung über das Avidin-Gel Säulenmaterial war in diesem Falle die Aufreinigung von beiden Untereinheiten AtuC und AtuF der Carboxylase möglich. Die Coelution von AtuC über das His-*Tag* tragende AtuF konnte deutlich in der Fraktion E3 beobachtet werden. Wie schon zuvor bei der Reinigung von Rohextrakt des Konstruktes pJoe4036.1::*liuBCD* konnte auch hier in der Waschfraktion W3/4 eine deutliche Proteinbande identifiziert werden. Eine Abschätzung des Molekulargewichts mit Hilfe der R_f-Werte ergab 28,2 kDa.

Da keine spezifischen Antikörper gegen das Protein LiuC zur Verfügung standen und auch bei der Aufreinigung des Konstruktes pJoe4036.1::*atuCF* eine Proteinbande ähnlicher Größe

im SDS-Gel zu beobachten war, kann zu diesem Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, dass es sich auch um ein unspezifisches Protein handeln könnte.





Um einen störenden Einfluss des Imidazols in folgenden Untersuchungen auszuschließen, wurden die entsprechenden Elutionsfraktionen vereinigt und in 0,1 M HEPES pH 7,5 umgepuffert. Eine Lagerung der Proteinlösungen erfolgte auf Eis bei 4 °C oder aliquotiert bei -20 °C. Letztendlich war es unter Verwendung der Konstrukte pJoe4036.1::*liuBCD* und pJoe4036.1::*atuCF* im Stamm *E. coli* JM109 möglich, rekombinantes Protein zu generieren. Pro g Feuchtgewicht konnten dabei ca. 16 mg an MCase Protein und ca. 2 mg an GCase-Protein zu erhalten.



 Abb. 4.25: Aufgereinigte, umgepufferte und aufkonzentrierte Untereinheiten der GCase und MCase M: Marker, 1: Proben aufgereinigt aus Rohextrakt *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*atuCF*_{His} Klon5 (2,9 μg), 2: Proben aufgereinigt aus Rohextrakt *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*liuBCD*_{His} Klon2 (12,5 μg)

Die Synthese von rekombinanten MCase und GCase Protein in E. coli konnte gezeigt werden. Jeweils beide Untereinheiten der MCase LiuB und LiuD konnten in E. coli Rohextrakten mittels SDS-PAGE bzw. Western-Blot Analyse identifiziert werden. Das gleiche Ergebnis konnte für die Untereinheiten der GCase AtuC und AtuF erzielt werden, auch wenn hier das Level an Protein geringer war, als im Vergleich zur MCase. Eine Aufreinigung über monomeres Avidin-Gel war wenig erfolgreich, da im Falle der MCase Untereinheiten zwar beide Proteine erhalten werden konnten, die Mengen jedoch gering waren. Vergleichbar dazu konnte AtuF lediglich in Spuren von der Säule isoliert werden. Die Konzentration an AtuC war demgegenüber noch geringer. Durch die Verwendung von Ni-NTA Agarose konnte die Aufreinigung verbessert werden. In beiden Fällen waren jeweils beide Untereinheiten in den Elutionsfraktionen festzustellen. Eine gemeinsame Aufreinigung durch Coelution war über den C-terminalen His-Tag an der jeweiligen Biotin-haltigen Untereinheit der Carboxylasen (LiuD bzw. AtuF) möglich. LiuC, welches durch das Konstrukt pJoe4036.1::liuBCD ebenfalls dargestellt wurde, konnte vermutlich in der Waschfraktion identifiziert werden. Aufgrund des Vorhandenseins einer Proteinbande vergleichbarer Größe bei der GCase-Aufreinigung konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass es sich auch um ein unspezifisches Protein im Rohextrakt von E. coli handel könnte.

4.3.3. Klonierung der GCase Untereinheiten vergleichbar zum MCase-Konstrukt

Da in durchgeführten Enzym Assays (Kap.4.4.) für die rekombinante MCase nicht aber für die GCase Aktivitäten erhalten werden konnten, sollte eine Klonierung der GCase codierenden Gene, vergleichbar zur Klonierung der entsprechenden Gene der MCase, durchgeführt werden (Abb. 4.27). Hiermit sollten strukturelle Hindernisse wie z.B. fehlende regulierende DNA Sequenzen, welche sich möglicherweise auf die Expression der beiden Gene *atuC* und *atuF* ausgewirkt haben könnten, ausgeschlossen werden.

Die MCase wurde als ganzes Fragment *liuBCD* aus *P. aeruginosa* amplifiziert, somit sollte nun auch das Fragment *atuC-atuF* mit den dazwischen liegenden Genen *atuD* und *atuE* als ganzes *atuCDEF* Fragment amplifiziert werden (Abb. 4.26).



Abb. 4.26: Schematische Darstellung des *atu*-Genclusters in *P. aeruginosa* PAO1 Dargestellt sind die relativen Positionen der Gene des *atu* Clusters in diesem Stamm. Der Pfeil verdeutlicht die Klonierungstrategie der GCase als ganzes *atuCDEF* Fragment.



Abb. 4.27: Vektorkarte des Konstruktes pJoe4036.1::*atuCDEF*_{His} Nach Amplifizierung des Fragmentes *atuCDEF* mit den Primern *atuC*_ExpGCase_upper und *atuF*_ExpGCase_lower, wird nach Verdau und Ligation mit dem Vektor pJoe4036.1 über die Schnittstellen *Nde*I und *Bam*HI das Konstrukt pJoe4036.1::*atuCDEF* erhalten. Nach Synthese von rekombinantem Protein trägt das AtuF den C-terminalen His-*Tag*.

Für die Amplifizierung der Gensequenz *atuCDEF* mit der PrimeSTARTMHS DNA Polymerase (TaKaRa) wurden die bereits vorhandenen Primer *atuC_*ExpGCase_upper (Einfügen einer *Nde*I Schnittstelle *upstream* vom *atuC*) und *atuF_*ExpGCase_lower (Einfügen einer *Bam*HI Schnittstelle downstream vom *atuF*) verwendet. Das Fragment mit einer theoretischen Größe von 5755 bp konnte erfolgreich amplifiziert werden (Abb. 4.28). Da das Genfragment jedoch eine zweite *Bam*HI Schnittstelle bei 1690 bp aufwies, wurde später ein partieller Verdau erforderlich.



Abb. 4.28: Amplifizierung der Gene der GCase Untereinheiten aus *P. aeruginosa* als *atuCDEF* Fragment

[A]: Probe der PCR Reaktion, [B]: Probe nach der Aufreinigung der PCR Reaktion M: Marker *Gene Ruler*[™] DNA *Ladder* Mix, 1: PCR *atuCDEF*. Es wurde jeweils 1µl der Proben aufgetragen.

Nach Aufreinigung des PCR Fragmentes schlossen sich der *Nde*I und der partielle *Bam*HI Verdau an. Hier traten jedoch Probleme auf. Zum einen gestaltete sich der partielle Verdau als schwierig, zum anderen wurden entsprechende Produkte zum Teil nach der Aufreinigung verloren. Schließlich erhaltene, aufgereinigte Fragmente wurden folgend mit dem entsprechend verdauten Vektor pJoe4036.1 ligiert und anschließend in den Stamm *E. coli* JM109 transformiert. Nach einigen Versuchen konnten Klone auf AIX-Platten auf das Vorhandensein des richtigen Konstruktes untersucht werden. Dies erfolgte zunächst über Kolonie-PCR und Testverdau (Daten nicht gezeigt). Schließlich wurden drei Kandidaten erhalten, welche in diesen Untersuchungen Signale der entsprechenden Größe zeigten und auch über die folgende Sequenzierung des gesamten Fragmentes *atuCDEF* aus dem Vektor pJoe4036.1 heraus bestätigt werden konnten.

4.3.4. Expression des atuCDEF Konstruktes und Reinigung des rekombinanten Proteins

Parallel zur Überprüfung der Konstrukte mittels Sequenzierung erfolgte die Untersuchung der Expression dieser Carboxylase-Konstrukte. Wurden die entsprechenden Rohextrakte zur Überprüfung der Expression und damit zur Kontrolle der Proteinzusammensetzung auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt, so konnte im mit Coomassie gefärbten Gel (Abb. 4.29) jedoch, wie bei den Konstrukten zuvor, lediglich eine Proteinbande festgestellt werden, die im Vergleich zum Kontrollstamm (*E. coli* JM109 pJoe4036.1) eine verstärkte Intensität aufwies. Durch Abgleich mit dem Größenstandard wurde diese Proteinbande als die

AtuC Untereinheit der Carboxylase identifiziert. Die Proteine AtuD (43 KDa), AtuE (28 kDa) sowie AtuF (72 kDa), als Träger des His-*Tags* konnte in diesem Falle nicht identifiziert werden.



Abb. 4.29: SDS-PAGE von E. coli Rohextrakten (40μg), 6 Stunden nach Induktion Mit Coommassie gefärbtes 12 %iges SDS-Gel.
M: Marker, 1: E. coli JM109 pJoe4036.1, 2: E. coli JM109 pJoe4036.1::atuCDEF Klon1, 3: E. coli JM109 pJoe4036.1::atuCDEF Klon2, 4: E. coli JM109 pJoe4036.1::atuCDEF Klon3

Im Folgenden sollte die Möglichkeit der Aufreinigung beider Untereinheiten der Geranyl-CoA Carboxylase über das Ni-NTA Agarose Material untersucht werden. Als Beispiel ist in der Abbildung 4.30 das Ergebnis für E. coli JM109 pJoe4036.1::atuCDEF Klon1 dokumentiert. Die Aufreinigung und somit der Erhalt beider Untereinheiten konnte hier nicht erreicht werden. An dieser Stelle eluierte lediglich eine Proteinbande von der Säule (E3/4). Wie bei den anderen Carboxylase-Konstrukten erfolgte die Elution des Proteins mit einer Imidazolkonzentration von 100 mM. Die Erhöhung der Imidazolkonzentration im Puffer bedingte keine erhöhte Proteinmenge im Eluat. Entsprechend der Größe handelte es sich bei dem erhaltenen Protein um das AtuF, welches in diesem Konstrukt direkt mit dem His-Tag fusioniert vorlag. Das Protein AtuC konnte in diesem Falle nicht gemeinsam mit dem AtuF, wie vergleichbar bei dem atuCF-Konstrukt bzw. beim liuBCD-Konstrukt und dessen Aufreinigung, gewonnen werden. Auch war es nach der Aufreinigung des Rohextraktes nicht möglich die Proteine AtuD und AtuE zu erhalten. Zwar trat in den Waschfraktionen und in den Elutionsfraktionen E2/3 eine Proteinbande mit ca. 28 kDa deutlich in Erscheinung (Abb. 4.30), jedoch war diese Bande auch bei der Aufreinigung der Konstrukte pJoe4036.1::liuBCD (Abb. 4.23) und pJoe4036.1:: atuCF (Abb. 4.24) zu finden, sodass angenommen werden muss, dass es sich hier um ein unspezifisches Protein handelte.

kDa	RE	W1	W2	W3	W4	М	E1	E 2	E3	E4	kDa	E5	E6	E7	E 8	М	E9	E10	E11	E12	
100-																+					
75-						-			_		100-	145				-					
50-		-	-			-			•	1	75-	1				1					
		8	_							AtuF	50-					-					
37-		=									37-										-
		88					-														-
25—											25-					-					
20-		12				-					20-	1				_					
20	37																				1

Abb. 4.30: Reinigung des Rohextraktes *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*atuCDEF* Klon1 über Ni-NTA Agarose

Jeweils 10 µl Probe der einzelnen Fraktionen wurden in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. RE: Rohextrakt, W1-2: Waschfraktionen (10 mM Imidazol), W3-4: Waschfraktionen (20 mM Imidazol), M: Marker, E1-E2: Elutionsfraktionen mit 50 mM Imidazol, E3-4: Elutionsfraktionen mit 100 mM Imidazol, E5-6: Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol, 7-8: Elutionsfraktionen mit 200 mM Imidazol, E9-10: Elutionsfraktionen mit 250 mM Imidazol, E11-12: Elutionsfraktionen mit 500 mM Imidazol

Um sicher zu stellen, dass das AtuC nicht aufgrund einer wesentlich geringeren Konzentration im SDS-Gel nicht beobachtet werden konnte, wurden die Protein-haltigen Fraktionen umgepuffert und mittels Vivaspin Zentrifugationskonzentrationseinheiten aufkonzentriert. Das in der Abbildung 4.31 dokumentierte Ergebnis zeigte deutlich das AtuF Protein mit einer Größe von ca. 72 kDa. Mögliche Banden, welche dem AtuC entsprechen könnten, waren dagegen nur in Spuren zu erkennen.



Abb. 4.31:Aufkonzentrierung der proteinhaltigen Fraktionen (E3-E4) über Zentrifugationsröhrchen
der Firma Vivaspin Vivascience zur Kontrolle der GCase-Untereinheiten
M: Marker, 1: E. coli JM109 pJoe4036.1::atuCDEF Klon1, 2: E. coli JM109
pJoe4036.1::atuCDEF Klon2, 3: E. coli JM109 pJoe4036.1::atuCDEF Klon3. Von jeder Probe
wurden 10 μl auf ein 12 %iges SDS-Gel aufgetragen, aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung
sichtbar gemacht.

Auch wenn bei der Kontrolle der Expression der Konstrukte im SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 4.29) das Protein AtuC im Rohextrakt in deutlichen Mengen identifiziert werden konnte, so sollte doch ein möglicher Einfluss der Expressionsbedingungen auf das Ergebnis nach der

Aufreinigung ausgeschlossen werden. Daher wurden die Kulturen bei 30 und 37 °C angezogen und die Expression der Gene atuCDEF zu unterschiedlichen Wachstumszeiten (bei einer OD_{600} von ca. 0,4; 0,6; 0,8 und 1) induziert. Für einen späteren Vergleich wurden die Stämme E. coli JM109 pJoe4036.1 und E. coli JM109 pJoe4036.1::liuBCD parallel kultiviert. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in den folgenden Abbildungen zusammengefasst (Abb. 4.32). Die Expression und damit die Synthese von rekombinantem AtuC war bei 37 °C (Abb. 4.32 [C]) stärker als bei 30 °C (Abb. 4.32 [A]). Auch hier konnte eine verstärkte Zunahme an Protein lediglich für eine Untereinheit der Geranyl-CoA Carboxylase (AtuC) im Coomassie-gefärbten SDS-Gel festgestellt werden. In der parallel dazu durchgeführten Western-Blot Analyse der Proben konnte die Biotin-haltige Untereinheit AtuF identifiziert werden. Im Gegensatz zum AtuC war die Menge des nachgewiesenen AtuF Proteins bei beiden Temperaturen vergleichbar (Abb. 4.32 [B], [D]). Bei der Induktions-OD₆₀₀ von 0,4 bzw. 0,6 wurden die besten Ergebnisse für das Protein AtuC erhalten (Abb. 4.32 [A], [C]: Spur 3 bzw. 4). Nur geringfügige Unterschiede bei der Synthese an rekombinantem Protein waren in diesem Falle festzustellen. Für das Protein AtuF wurde im Western-Blot deutlich, dass eine Induktions-OD₆₀₀ von 0,8 bzw. 1 etwas stärkeres Proteinsignale bedingte (Abb. 4.32 [B], [C]: Spur 5 und 6).



Abb. 4.32: SDS-PAGE [A, C] und Western-Blot Analyse [B, D] von E. coli Rohextrakten, nach Wachstum bei 30 °C [A, B] bzw. 37 °C [C, D] und 6 Stunden nach Induktion Gezeigt sind die mit Coomassie gefärbten SDS-Gele [A, C] und der Nachweis der Biotinhaltigen Proteine im Western Blot [B, D]. Aufgetragen wurden jeweils 50 μg Protein der Rohextrakte.
M: Marker, 1: E. coli JM109 pJoe4036.1, 2: E. coli JM109 pJoe4036.1::MCase (liuBCD), 3-6:

M: Marker, 1: *E. coli* JM109 pJoe4036.1, 2: *E. coli* JM109 pJoe4036.1::MCase (*liuBCD*), 3-6: *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*atuCDEF* mit ansteigender Induktions-OD₆₀₀ von 0,4, 0,6, 0,8 und 1. Die Rohextrakte des Expressionsversuches wurden folgend ebenfalls einer Aufreinigung über Ni-NTA Agarose unterzogen. Leider konnte die zuvor nicht erfolgreiche Aufreinigung (Abb. 4.30) auch durch veränderte Expressionsbedingungen, aber auch durch Regeneration des Säulenmaterials nicht verbessert werden (Daten nicht gezeigt). Eine Coelution des AtuC Proteins über das AtuF_{His} Protein war auch in diesen Fällen nicht möglich.

4.3.5. Klonierung der codierenden Sequenzen der Geranyl-CoA Carboxylase unter Verwendung des Vektorsystems pCOLA Duet[™]-1

Parallel zu den Versuchen der Generierung der Carboxylase Untereinheiten AtuC und AtuF über das Konstrukt pJoe4036.1 wurde eine weitere Klonierungsstrategie ins Auge gefasst. Hierfür kam ein neuer Vektor, der pCOLA DuetTM-1 von Novagen zum Einsatz. Als Besonderheit besitzt dieser Vektor zwei Expressionseinheiten (Abb. 4.33), welche jeweils von einem T7*lac*Promotor kontrolliert werden. Des Weiteren verfügen beide Einheiten über eine separate Ribosomenbindestelle (RBS). Mit Hilfe dieses Vektors sollte somit eine Coexpression von zwei Genen, welche in die zwei vorliegenden *multi cloning sites (mcs)* kloniert werden können, möglich sein. Für eine spätere Aufreinigung über Affinitätschromatographie stehen sowohl ein N-terminaler His-*Tag* als auch ein C-terminaler Strep-*Tag* zur Verfügung (Novagen, Zverev & Khmel, 1985).

Um ein mögliches Stören eines *Tags* am C-terminalen Ende der Biotin-haltigen Untereinheit des AtuF Proteins auszuschließen und da das Material Ni-NTA Agarose bereits zur Verfügung stand, wurde hier zunächst der N-terminale His-*Tag* am AtuC für das gewünschte Konstrukt ausgewählt. Für spätere Untersuchungen wäre auch der C-terminale Strep-*Tag* möglich.

$1 ggggaattgtgagcggataacaattcccctgtagaaataattttgtttaactttaat \underline{aag}$	0 1 14						
61 gagatataccatgggcagcagcagcatcaccatcaccacagccaggatccgaattcgag	Expressionseinheit 1						
121 ctcggcgcgcctgcaggtcgacaaggtcgcgcgcataatgcttaagtcgaacagaaag							
lac operator, rbs, His-Tag, BamHI, EcoRI, HindIII							
181 taatcgtattgtacacggccgcataatcgaaatt <u>aatacgactcactataggggaattgt</u> Sequenzause 241 gagcggataacaattcccccatcttagtatattagttaagtataagaaggagatatacata Sequenzause 301 tggcagatctcaattggatatcggccggccacgcgatcgctggacgtcggtaccctcgagt T7 promotor-2, lac operator, rbs, Ndel, EcoRl, Fsel							

Abb. 4.33: Schematische Darstellung der hier wichtigen Strukturen des pCOLA Duet[™]-1 Vektors Gezeigt sind die Ausschnitte aus den zwei benötigten Expressionseinheiten mit wichtigen farbig markierten Strukturen. rbs: Ribosomenbindestelle; *Bam*HI, *EcoRI*, *Hind*III, *NdeI* und *FseI*: entsprechende Restriktionsschnittstellen der Enzyme Die einzelnen Genfragmente wurden mit den Primern His_*atuC*-upper und *atuC_Hind*III_low bzw. *atuF_Nde*I_upper und *atuF_Fse*I_lower aus der genomischer DNA von *P. aeruginosa* amplifiziert. Nach Verdau mit den Restriktionsendonukleasen *EcoR*I und *Hind*III wurde *atuC* in die *mcs*I, d.h. in die erste Expressionseinheit des Vektors pCOLA Duet^M-1 kloniert (Abb. 4.34). Erhaltene Klone nach der Transformation in den Stamm *E. coli* JM109 wurden über Testverdau und Kolonie-PCR überprüft. Durch die sich anschließende Sequenzierung konnte bei drei Klonen auch die Sequenz als richtig bestätigt werden. Das Plasmid pCOLA::*atuC* Klon1/11 wurde infolgedessen weiter verwendet und mit den Enzymen *Nde*I und *Fse*I geschnitten. Das Konstrukt wurde im Anschluss mit dem verdauten *atuF* Fragment ligiert, wobei dieses Gen über die gewählten Schnittstellen *Nde*I und *Fse*I in die *mcs*II der zweiten Expressionseinheit kloniert wurde (Abb. 4.35; 4.36). Dieses Konstrukt (Abb. 4.36) wurde wiederum in den Stamm *E. coli* JM109 transformiert und erhaltene Klone wie bereits beschrieben überprüft. Vier Klone konnten durch Testverdau und Kolonie-PCR als positiv bestätigt werden. Und auch die Sequenz der Konstrukte erwies sich in allen vier Fällen als richtig.



Abb. 4.34: Vektorkarte des Konstruktes pCOLA Duet[™]-1::_{His}atuC

Nach Amplifizierung des Fragmentes atuC mit den Primern His_atuC-upper und $atuC_HindIII_low$, wird nach Verdau und Ligation mit der *multi cloning site* (mcs)I des Vektor pCOLA Duet-1TM über die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *HindIII* das Konstrukt erhalten. Das Gen atuC ist dabei mit den codierenden Sequenzen des N-terminalen His-Tags fusioniert.

<i>atuC</i> , 1617 bp <u>A</u>	
Ndel atuF, 1986 bp HindIII	
ATGCCCAGCTTCAACAAGATCCTCGTCGAACTGGGGCTACCGCAGCGTCGCCGTGT	
-//- GCGAGCAGGTGCGCAACCGGCAGGTGCTGGTCGAGGTGGAAGCCGACGCCTGA	
Verdau und Ligation in den Vektor über die angezeigten Schnittstellen	
<pre>1 ggggaattgtgagcggataacaattccccctgtagaaataattttgtttaactttaataag 61 gagatataccatgggcagcagccatcaccatcatcaccacagccaggatccgaattc -> - A-Sequenz atuC -</pre>	
Ausschnitt Expressionseineit 1: lac operator, rbs, His-Tag, BamHI, EcoRI, HindIII	
taatcgtattgtacacggccgcataatcgaaat <u>taatacgactcactataggggaattgt</u> <u>gagcggataacaattcc</u> ccatcttagtatattagttaagtataag <u>aaggag</u> atata <u>catatg</u> -> - Sequenz atuF ggccggccacgcgatcgctgacgtcggtaccctcgagt	
Ausschnitt Expressionseineit 2: promotor-2, lac operator, rbs, NdeI, FseI	

Abb. 4.35: Schematische Darstellung der durchgeführten Klonierung von atuC und atuF in den Vektor pCOLA DuetTM-1

Dargestellt sind die beiden verkürzten Gensequenzen mit den ausgewählten Primerpaaren (obere Abschnitt) und ihre Position in den jeweiligen Expressionseinheiten des Vektors pCOLADuet-1[™] nach erfolgter Ligation (untere Abschnitt).



Abb. 4.36: Vektorkarte des Konstruktes pCOLA Duet[™]-1::_{His}atuC::atuF Verwendung des pCOLA Duet[™]-1::_{His}atuC-Konstruktes und Klonierung des Fragmendes atuF über die Schnittstellen NdeI und FseI in die multi cloning site (mcs)II des Vektors.

Neben den Konstrukten pCOLA::*atuC* Klon 1/11 und pCOLA::*atuCF* Klon 1/10 wurde auch, als eine mögliche Kontrolle, das Konstrukt pCOLA::*atuF* (Abb. 4.37) hergestellt. Dies erfolgte in analoger Weise, wie bereits zuvor für die anderen Konstrukte beschrieben. Das *atuF* lag in diesem Konstrukt ohne fusionierte *Tag*-Seqenzen vor.



Abb. 4.37: Vektorkarte des Konstruktes pCOLA Duet-1[™] ::*atuF* Nach Amplifizierung des Fragmentes *atuF* mit den Primern *atuF_NdeI_upper* und *atuF_FseI_lower* wird nach Verdau und Ligation mit der *multi cloning site* (mcs)II des Vektor pCOLA Duet-1[™] über die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *NdeI* und *FseI* das Konstrukt erhalten. Das Gen *atuF* ist nicht mit codierenden Sequenzen eines *Tags* fusioniert.

4.3.6. Expression der pCOLA-Konstrukte und Aufreinigung der synthetisierten Proteine

Nachdem alle drei möglichen Konstrukte vorlagen, wurden diese aus dem Stamm *E. coli* JM109 isoliert und in den Stamm *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS RARE, in welchem die Expression untersucht werden sollte, eingebracht. Die Anzucht der Stämme erfolgte in LB-Medium bei 30 °C. Die Induktion der Expression wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 durch Zugabe von 1 mM IPTG-Lösung gestartet. Nach Zugabe von IPTG und einer weiteren Inkubation von 6 Stunden wurden die Zellen geerntet und die nach Aufschluss der Zellen erhaltenen löslichen Extrakte weiter untersucht.

Die Expression der Gene und damit die Synthese an rekombinantem Protein wurde durch Auftrennung der Rohextrakte auf SDS-Gelen untersucht. Durch die mit Coomassie angefärbten Gele (Abb. 4.38 [A] bzw. Abb. 4.39 [A]) konnten verschiedene verstärkte Proteinbanden im Vergleich zu den Rohextrakten der Kontrollstämme (Abb. 4.38 [A]/ 4.39 [A], Spur 1: *E.coli* JM109 pJoe4036.1; Spur 5: *E.coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS RARE pCOLA DuetTM-1) identifiziert werden. Wurden das leere Konstrukt pJoe4036.1 (Spur 1) und die

entsprechenden Carboxylase Konstrukte (MCase: Spur 2 und GCase: Spur 3/4) verglichen, so konnte in diesen Proben die kleinere der beiden Untereinheiten als verstärkte Bande im Gel festgestellt werden (LiuB bzw. AtuC). Im Vergleich dazu wurden bei den pCOLA Konstrukten verschiedene verstärkte Banden beobachtet. Im Falle des pCOLA::*atuC* Konstruktes (Spur 6) wurde das AtuC und im Falle der Konstrukte pCOLA::*atuF* (Spur 7) und pCOLA::*atuCF* (Spur 8) das Protein AtuF und somit die größere der beiden Untereinheiten identifiziert. Eine Bande, welche der Größe nach dem AtuC entsprechen könnte, war in den beiden letzteren Konstrukten ebenfalls zu beobachten, wobei diese aber eine schwächere Intensität zeigte, als im pCOLA::*atuC* Konstrukt (Spur 6). Zusätzlich trat bei pCOLA::*atuF* (Spur 7) noch eine weitere kleinere Bande deutlich in Erscheinung. Warum eine Bande der Größe nach AtuC auch im Konstrukt ohne *atuC* (pCOLA::*atuF*, Spur 7) auftrat, bleibt unklar.

Bei der Untersuchung mittels Western-Blot und Streptavidin Antikörper Konjugat (Abb. 4.38 [B]) konnten in den Rohextrakten der Kulturen mit dem leeren Konstrukt pCOLA (Spur 5) und mit dem Konstrukt pCOLA::*atuC* (Spur 6) wie erwartet keine Signale beobachtet werden, da ein Biotin Nachweis ohne vorhandene Biotin-haltige Untereinheit nicht möglich sein sollte. In den Rohextrakten der Stämme mit den Konstrukten pCOLA::*atuF* (Spur 7) und pCOLA::*atuCF* (Spur 8) konnten jedoch neben einem starken Signal des AtuF Proteins auch diverse andere Banden, welche jedoch nicht in der Kontrolle (leere Vektor, Spur 5) in Erscheinung traten, detektiert werden. Im Falle der pJoe4036.1 Konstrukte konnte das schon bekannte Bild erhalten werden. Mittels Streptavidin Antikörper Konjugat wurden im Falle der MCase (*liuBCD*) LiuD (Spur 2) und im Falle der GCase das AtuF (Spur 3/4) nachgewiesen.



Abb. 4.38: SDS PAGE von *E. coli* Rohextrakten (30 °C) nach Coomassie-Färbung [A] und Western-Blot Analyse zum Nachweis Biotin-haltiger Proteine mit Streptavidin Antikörper Konjugat [B].

Aufgetragen wurden jeweils 40 µg Protein der Rohextrakte.

M: Marker, 1: E. coli JM109 pJoe4036.1, 2: E. coli JM109 pJoe4036.1::MCase (*liuBCD*), 3: E. coli JM109 pJoe4036.1::GCase (*atuCF*), 4: E. coli JM109 pJoe4036.1::*atuCDEF*, 5: E. coli Rosetta pCOLA, 6: E. coli Rosetta pCOLA::*atuC*, 7: E. coli Rosetta pCOLA::*atuF*, 8: E. coli Rosetta pCOLA::*atuCF*, 9: Rohextrakt P. aeruginosa PAO1 Cs Zellen Wurden die gleichen Proben in einer Western-Blot Analyse mit His-*Tag* Antikörpern eingesetzt (Abb. 4.39 [B]), so zeigten sich wie erwartet keine Signale in den Proben mit den leeren Vektoren (pJoe4036.1: Spur 1; pCOLA: Spur 5) und dem Konstrukt pCOLA::*atuF* (Spur 7), also Proben welchen keinen His-*Tag* aufwiesen. In der Probe pJoe4036.1::*liuBCD* konnte LiuD über den C-terminalen His-*Tag* detektiert werden (Spur 2). Ebenfalls über den entsprechenden C-terminalen *Tag* war es möglich, das AtuF Protein der Konstrukte pJoe4036.1::*atuCF* und pJoe4036.1::*atuCDEF* in den jeweiligen Proben als Signal eindeutig zu identifizieren (Spur 3/4). Bei den Proben der Konstrukte pCOLA::*atuC* (Spur 6) und pCOLA::*atuCF* (Spur 8), welche am vorliegenden AtuC einen N-terminalen His-*Tag* aufwiesen, konnten wiederum neben dem AtuC auch andere Signale festgestellt werden, welche nicht in der Kontrolle (Spur 5) und auch nicht in der Probe pCOLA::*atuF* (Spur 7) detektiert wurden. Warum im Falle der pCOLA Konstrukte immer auch deutliche Signale von unspezifischen Banden erhalten wurden, welche sich jedoch nicht in der Kontrolle (Spur 5) zeigten, bleibt unklar. Sicher ausgeschlossen werden kann jedoch, dass es sich um eine unspezifische Reaktion des sekundären Antikörpers handelte (Daten nicht gezeigt).



Abb. 4.39: SDS PAGE von E. coli Rohextrakten (30 °C) nach Coomassie-Färbung [A] und Western-Blot Analyse zum Nachweis His-getagter Proteine mit Hilfe von His-Tag-Antikörper [B] Aufgetragen wurden jeweils 40 μg Protein der Rohextrakte.
M: Marker, 1: E. coli JM109 pJoe4036.1, 2: E. coli JM109 pJoe4036.1::MCase (liuBCD), 3: E. coli JM109 pJoe4036.1::GCase (atuCF), 4: E. coli JM109 pJoe4036.1::atuCDEF, 5: E. coli Rosetta pCOLA, 6: E. coli Rosetta pCOLA::atuC, 7: E. coli Rosetta pCOLA::atuF, 8: E. coli Rosetta pCOLA::atuCF, 9: Rohextrakt P. aeruginosa PAO1 Cs Zellen

Um die Aufreinigung der einzelnen pCOLA-Konstrukte vergleichen zu können, wurden folgend gleiche Mengen an Protein der Rohextrakte (50 mg) auf Ni-NTA Agarose Material (hier: GraviFlow Säulchen) aufgetragen und nach dem gleichen Protokoll mit einem steigenden Imidazolgradienten im Elutionspuffer aufgereinigt (Abb. 4.40-4.42). Wie erwartet, war keine Aufreinigung aus Rohextrakt des Konstruktes pCOLA::*atuF* möglich. Aufgrund

eines hier fehlenden *Tags* am Protein für die Affinitätschromatographie handelte es sich bei den hier erhaltenen schwachen Signalen um unspezifische Proteinbanden (Abb. 4.40).



Abb. 4.40: Reinigung des Rohextraktes *E. coli* Rosetta pCOLA::*atuF* über Ni-NTA Agarose Jeweils 10 μl Probe der einzelnen Fraktionen wurden in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.
M: Marker, RE: Rohextrakt, DF: Durchfluss, W1-2: Waschfraktionen (10 mM Imidazol), W3-4: Waschfraktionen (20 mM Imidazol), E1-E2: Elutionsfraktionen mit 50 mM Imidazol, E3-4: Elutionsfraktionen mit 100 mM Imidazol, E5-6: Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol, 7-8: Elutionsfraktionen mit 200 mM Imidazol, E9-10: Elutionsfraktionen mit 250 mM Imidazol, E11-12: Elutionsfraktionen mit 500 mM Imidazol

Aus Rohextrakt des Kontruktes pCOLA::*atuCF* konnten die beiden Untereinheiten der Geranyl-CoA Carboxylase nicht isoliert werden (Abb. 4.41). Eine Bande der Größe nach AtuC entsprechend, welches den N-terminalen *Tag* trägt, konnte nicht identifiziert werden. Jedoch traten zwei deutliche Banden etwas über der 25 kDa Markerbande und zwei schwache Banden etwas unterhalb der 75 kDa Markerbande auf. Eine Untersuchung dieser Proteinbanden erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht.



Abb. 4.41: Reinigung des Rohextraktes E. coli Rosetta pCOLA::atuCF über Ni-NTA Agarose Jeweils 10 μl Probe der einzelnen Fraktionen wurden in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. RE: Rohextrakt, W1-2: Waschfraktionen (10 mM Imidazol), W3-4: Waschfraktionen (20 mM Imidazol), M: Marker, E1-E2: Elutionsfraktionen mit 50 mM Imidazol, E3-4: Elutionsfraktionen mit 100 mM Imidazol, E5-6: Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol, 7-8: Elutionsfraktionen mit 200 mM Imidazol, E9-10: Elutionsfraktionen mit 250 mM Imidazol, E11-12: Elutionsfraktionen mit 500 mM Imidazol

Bei der versuchten Aufreinigung von Rohextrakt *E. coli* Rosetta pCOLA::*atuC* konnten im Vergleich zu den zuvor untersuchten Konstrukten gleich fünf deutliche Banden und einige Signale schwächere Intensität in den Eluaten gefunden werden (Abb. 4.42). Eine der Banden im Bereich der 50 und 75 kDa Markerbanden könnte dabei die Untereinheit AtuC der Carboxylase darstellen. Die Reinigung war jedoch aufgrund der Anzahl der erhaltenen Signale nicht erfolgreich. Da eine weitere Untersuchung der einzelnen Signale an dieser Stelle nicht erfolgte, kann nicht geklärt werden, ob es sich bei den diversen Signalen um Zersetzungsprodukte, aufgrund der Probenvorbereitung, oder generell um unspezifische Proteine handelt.



Abb. 4.42: Reinigung des Rohextraktes E. coli Rosetta pCOLA::atuC über Ni-NTA Agarose Jeweils 10 μl Probe der einzelnen Fraktionen wurden in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.
RE: Rohextrakt (40 μg), W1-2: Waschfraktionen (10 mM Imidazol), W3-4: Waschfraktionen (20 mM Imidazol), M: Marker, E1-E2: Elutionsfraktionen mit 50 mM Imidazol, E3-4: Elutionsfraktionen mit 100 mM Imidazol, E5-6: Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol, 7-8: Elutionsfraktionen mit 200 mM Imidazol, E9-10: Elutionsfraktionen mit 250 mM Imidazol, E11-12: Elutionsfraktionen mit 500 mM Imidazol

In einem weiteren Versuch wurden Rohextrakte der *E. coli* Stämme mit den Konstrukten pCOLA::*atuC* und pCOLA::*atuF* gemischt und über Nacht auf Eis inkubiert. Ein mögliches Zusammenfinden der Untereinheiten in diesem Mix und folgend eine mögliche gemeinsame Aufreinigung vergleichbar mit dem Konstrukt pJoe4036.1::*atuCF* konnte allerdings nach den entsprechenden Reinigungsschritten nicht festgestellt werden (Abb. 4.43). Das Bild der "Reinigung" entsprach hier annähernd dem Bild der "Aufreinigung" des Rohextraktes von *E. coli* pCOLA::*atuC*.



Abb. 4.43: Reinigung der gemischten und auf Eis inkubierten Rohextrakte E. coli Rosetta pCOLA::atuC und E. coli Rosetta pCOLA::atuF über Ni-NTA Agarose
Jeweils 10 μl Probe der einzelnen Fraktionen wurden in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel
aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.
RE: Rohextrakt (40 μg), DF: Durchfluss, W1-2: Waschfraktionen (10 mM Imidazol), W3-4:
Waschfraktionen (20 mM Imidazol), M: Marker, E1-E2: Elutionsfraktionen (50 mM Imidazol),
E3-4: Elutionsfraktionen (100 mM Imidazol), E5-6: Elutionsfraktionen (150 mM Imidazol), 7-8:
Elutionsfraktionen mit 200 mM Imidazol, E9-10: Elutionsfraktionen mit 250 mM Imidazol,
E11-12: Elutionsfraktionen mit 500 mM Imidazol

Durch die Verwendung des Vektorsystems pCOLA DuetTM-1 und den hier gewählten Bedingungen war zwar eine Synthese der rekombinanten Proteinuntereinheiten der Geranyl-CoA Carboxylase aus *P. aeruginosa* in *E. coli* möglich, jedoch war eine gemeinsame Aufreinigung dieser über den am AtuC angefügten N-terminalen His *Tag* über Ni-NTA Agarose nicht erfolgreich.

4.4. Versuche zur Bestimmung von Enzymaktivitäten der rekombinanten Carboxylasen

Die rekombinanten Enzyme Methylcrotonyl-CoA und Geranyl-CoA Carboxylase, welche durch *E. coli* synthetisiert und folgend über Ni-NTA Agarose aufgereinigt werden konnten, wurden zur Bestimmung der Enzymaktivitäten in den bereits beschrieben Carboxylase Assay eingesetzt. Bei diesen rekombinanten Proteinen handelte es sich zum einen um die aus dem Konstrukt pJoe4036.1::*liuBCD* gewonnenen Untereinheiten LiuB und LiuC der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase und um die aus den Konstrukten pJoe4036.1::*atuCDEF* gewonnenen Untereinheiten der Geranyl-CoA Carboxylase AtuC und AtuF.

4.4.1. Untersuchung der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Aktivität

Bei der Verwendung von partiell aufgereinigten *P. aeruginosa* Rohextrakten konnte bereits eine Aktivität der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase festgestellt werden. Ein Beispiel für den typischen Verlauf der Reaktionen wurde im Kap.4.2. in den Abb. 4.5 und 4.6 dargestellt. Hier konnte bei Einsatz von partiell aufgereinigtem Rohextrakt von Zellen, die auf Isovaleriansäure als Kohlenstoff- und Energie-Quelle angezogen wurden, eine spezifische Aktivität von 5900 mU/mg mit selbstsynthetisierten Methylcrotonyl-CoA (MCoA) bzw. 5400 mU/mg mit käuflichem MCoA (Sigma) berechnet werden. Mit den aufgereinigten, rekombinanten Enzymen aus *E. coli* wurden folgend ebenfalls Versuche unternommen, Enzymaktivitäten zu bestimmen.

Bei der Untersuchung der rekombinanten MCase (pJoe4036.1::*liuBCD*) im Carboxylase Assay konnte eine maximale Aktivität von 5320 mU/mg festgestellt werden. Im Mittel lag diese Aktivität im Bereich von 2700 \pm 1260 mU/mg (n = 16). Somit konnten sowohl mit aufgereinigtem Enzym aus dem Wildtypstamm *P. aeruginosa* (Abb. 4.6, 5900 mU/mg), als auch mit rekombinantem Enzym (Abb. 4.44, 5320 mU/mg) vergleichbare Aktivitäten mit Methylcrotonyl-CoA bestimmt werden. Die Unterschiede im Reaktionsverlauf, welche sich in den entsprechenden Abbildungen zeigten, sind dabei auf die Menge des eingesetzten Enzyms zurückzuführen. Während bei der Reaktion mit Wildtypenzym (0,8 µg Protein, aufgereinigt aus Iso Zellen) die Änderung der Absorption über einen längeren linearen Verlauf beobachtet werden kann ($\Delta E = -0,1759/4,74$ min), ist die Reaktion mit rekombinantem Enzym (8,2 µg Enzym) wesentlich schneller und steiler in ihrem Verlauf (Abb. 4.44). Die Änderung der Absorption im linearen Bereich erfolgte in diesem Falle innerhalb von 1,19 min ($\Delta E = -0,0489/1,19$ min).



Abb. 4.44: Enzymassay zur Bestimmung der MCase-Aktivität mit rekombinantem in *E. coli* synthetisiertem und über Ni-NTA aufgereinigtem Enzym Bei Verwendung von 20µl aufgereinigter MCase (0,41mg/ml) und selbstsynthetisiertem MCoA

konnte eine Enzymaktivität von 5320 mU/mg bestimmt werden

Mit einer Substratkonzentration von 1 mM bzw. 0,5 mM im Ansatz wurde im Sättigungsbereich des Enzyms gearbeitet. Daher konnte bei Variation der Menge an Substrat, also Methylcrotonyl-CoA, auch keine veränderte Reaktion festgestellt werden. Letztentlich konnte das Abflachen des Reaktionsverlaufes auf die Phosphoenolpyruvat (PEP)-Konzentration zurückgeführt werden. Die Konzentration von 0,2 mM stellte sich in diesem Falle als limitierend heraus. Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Assasys jedoch aufrechtzuerhalten, wurde diese Konzentration beibehalten. Nichtsdestotrotz mussten die einzelnen Chargen an selbst hergestellten CoA-Estern vor ihrem Einsatz in einem Assay ohne Enzym getestet werden, da es unter Umständen auch zu Eigenreaktionen, welche nicht durch das zu testende Enzym bedingt waren, kam (Daten nicht gezeigt). Diese Chargen konnte für weitere Messungen nicht eingesetzt werden.

Die Lagerung der Enzymlösung auf Eis für weitere drei Tage reduzierte die spezifische Aktivität deutlich auf 720 mU/mg (Daten nicht gezeigt).

Ein möglicher Beitrag von Reduktionsmitteln wie DTT und Glutathion zur Stabilisierung des Enzyms wurde daraufhin getestet. Die Ergebnisse sind in der Abb. 4.45 graphisch dargestellt. Dabei ist aus den Daten ersichtlich, dass schon mit der Zugabe von DTT zum Assay eine etwas höhere Aktivität (560 mU/mg) im Vergleich zum Ansatz ohne DTT Zugabe (400 mU/mg) erhalten wurde. Die Zugabe von Glutathion dagegen hatte eine nur etwas geringere MCase Aktivität zur Folge (300 mU/mg). Wurden die Proben folgend weiter auf Eis bzw. bei -20 °C gelagert so konnte bei der Probe ohne Zusatz nur noch eine sehr geringe Aktivität von 58 mU/mg (auf Eis gelagerte Probe) bzw. keine Aktivität der bei -20 °C gelagerten Probe festgestellt werden. Der Zusatz von DTT zur Proteinlösung bewirkte bei Lagerung auf Eis eine Steigerung der Aktivität auf 1100 mU/mg. Die Aktivität der bei -20 °C gelagerten Probe war vergleichbar mit der Messung drei Tage zuvor (640 mU/mg). Der Einfluss von Glutathion auf das Protein war weniger gravierend. Die Aktivität der auf Eis gelagerten Probe lag bei 200 mU/mg und war somit nur geringfügig vermindert gegenüber der zuvor gemachten Messung mit frischem Enzym. Bei Messung der Aktivität der Probe, welche bei -20 °C gelagert wurde, konnte dagegen eine geringfügige Zunahme (500 mU/mg) beobachtet werden. Erfolgte die Kontrolle der Enzymaktivitäten erneut nach 20 Tagen, so konnten sowohl für das Enzym ohne Zusätze als auch für die Enzyme mit Zusätzen, welche auf Eis gelagert wurden, keine Aktivitäten mehr festgestellt werden. Für die bei -20 °C gelagerten Proben dagegen konnte in beiden Fällen eine Steigerung der Aktivität im Falle der DTT-Probe auf 1800 mU/mg und im Falle der Glutathion-Probe auf 900 mU/mg bestimmt werden. In beiden Fällen konnte im Vergleich zur ersten Messung mit frischem Enzym eine ca. 3-fache Steigerung der Aktivität verzeichnet werden. Bei noch längerer Lagerung über drei Monate hinweg bei -20 °C konnte keine Enzymaktivität mehr festgestellt werden.



Abb. 4.45: Bestimmung des Einflusses von Reduktionsmitteln wie DTT bzw. Glutathion auf die Stabilität (Aktivität) der MCase Proteinlösung bei weiterer Lagerung auf Eis im Kühlraum bzw. bei -20 °C

Durch Zugabe von DTT und Glutathion konnte die Stabilität der Proteinlösung über längere Zeit erhalten werden. Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen jedoch zu erhalten, ist es erforderlich alle Proben in der gleichen Art und Weise zu behandeln. In der vorliegenden Arbeit wurde somit auf die Zugabe von DTT bzw. Glutathion verzichtet, und die Proteine zeitnah nach ihrer Aufreinigung auf Aktivität hin getestet, um die Vergleichbarkeit mit den früheren Messungen zu gewährleisten. Für das Fortführen der Arbeiten bleibt zu überlegen, gegebenenfalls schon bei der Aufreinigung der entsprechenden Proteine die Zugabe von DTT bzw. Glutathion in Betracht zu ziehen.

4.4.2. Untersuchung der Geranyl-CoA Carboxylase Aktivität

Im Gegensatz zur MCase Aktivität von aufgereinigten *P. aeruginosa* Rohextrakten (Isovaleriansäure und Citronellsäure Zellen) konnte in der Vergangenheit keine Aktivität mit Geranyl-CoA bestimmt werden. Im Folgenden sollten nun auch die rekombinanten Enzyme auf ihre Aktivität mit Geranyl-CoA hin untersucht werden.

4.4.2.1. Untersuchung der pJoe4036.1::atuCF Konstrukte

Bei der Verwendung von rekombinanten Protein aus *E. coli*, welches über das Konstrukt pJoe4036.1::*atuCF* synthetisiert und über Ni-NTA Agarose aufgereinigt wurde, waren ebenfalls keine signifikanten Aktivitäten im Carboxylase Assay mit diesem Substrat zu bestimmen (Daten nicht gezeigt).

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass in *E. coli* möglicherweise nicht ausreichend Biotin für den Einbau in das Carboxylase-Enzym zur Verfügung stand, erfolgte bei folgenden Zellanzuchten immer die Zugabe von zusätzlichem Biotin (1 μ g/ml). Mit entsprechend aufgereinigten Proteinen konnte jedoch weiterhin im Falle der Geranyl-CoA Carboxylase keine Aktivität erhalten werden. Auch die direkte Zugabe von Biotin in den Ansatz des Enzymassays brachte keine Verbesserung und damit keine Aktivität. Der Verlauf der Reaktion konnte nicht verändert werden und lediglich das charakteristische Bild war festzustellen (Abb. 4.46 [A]).

Da bei den Untersuchungen der Geranyl-CoA Carboxylase bei Seubert et *al.* (1963) Glutathion der Enzymreaktion zugesetzt wurde, sollte dies auch bei dem hier vorliegenden Enzym gestestet werden. Die Zugabe von 10 μ l einer 0,2 mM Glutathion Stammlösung zum Reaktionsmix zeigte jedoch keinen Einfluss auf den Reaktionsverlauf. Eine Aktivität konnte auch in diesen Fällen nicht festgestellt werden (Abb. 4.46 [B]).



Abb. 4.46: Enzymassay zur Bestimmung der GCase-Aktivität mit rekombinantem in *E. coli* synthetisiertem und über Ni-NTA Agarose aufgereinigtem Enzym Verwendung von 20 μl aufgereinigter GCase (0,19 mg/ml) und selbstsynthetisiertem GCoA (0,5 mM). In [A] war der Hintergrund stärker als die eigentliche Reaktion, welche mit der Zugabe von GCoA gestartet wurde. Hier konnte somit keine Aktivität bestimmt werden. In [B] enthält der Ansatz zusätzlich 2 μM Glutathion. Eine Aktivität kann nach Zugabe von GCoA (0,5 mM) auch hier nicht festgestellt werden.

Chemische Reaktionen verlaufen meist als Gleichgewichtsreaktionen. Solch ein sich einstellendes Gleichgewicht zwischen Edukten und Produkten einer Reaktion kann durch Veränderung der Reaktionsbedingungen in eine bestimmte Richtung verschoben werden. Das Abziehen eines Produktes einer Reaktion z.B. kann somit das Gleichgewicht in Richtung der Produkte verlagern. In der Annahme die Reaktion der Geranyl-CoA Carboxylase mit GCoA sei eine nur sehr langsam und schwach ablaufende Reaktion, welche somit nicht unmittelbar zu verfolgen sein könnte, wurde die Möglichkeit getestet, die Reaktion durch Zugabe der sich im Reaktionsverlauf anschließenden Enzyme in die Richtung des Isohexenyl-glutaconyl-CoAs zu ziehen. Abgesehen von dieser Vermutung besteht aber auch die Möglichkeit, dass die drei Enzyme Geranyl-CoA Carboxylase, Isohexenylglutaconyl-CoA Hydratase (AtuE) und die 3-Hydroxy-3-isohexenylglutaryl-CoA:Acetat Lyase (möglicherweise AtuA) einen gemeinsamen Komplex bilden und gegebenenfalls dadurch sich selbst bzw. die gebildeten Zwischenprodukte der Reaktionen stabilisieren. Um diese Möglichkeit zu überprüfen wurde dem Geranyl-CoA Carboxylase Assay das GCase Protein bzw. eine Mischung aller drei Proteine, welche rekombinant von E. coli gebildet und aus diesen gewonnenen Extrakten aufgereinigt wurden (Kap.4.5.3. bzw. 4.5.5.), zugesetzt. Aktivitäten waren jedoch auch bei diesen Versuchen nicht festzustellen (Abb. 4.47). Ein Einfluss der nachfolgenden Enzyme auf die Aktivität der Carboxylase konnte mit diesen Messungen nicht gezeigt werden. Durch die rekombinante Synthese der Proteine ist es möglich, das eine andere zum Wildtyp verschiedene Faltung bzw. ein anderer Zusammenbau der einzelnen Untereinheiten im Falle der GCase in E. coli erfolgte. Aufgrund der Verwendung von diesen Proteinen konnte ein Einfluss somit aber auch nicht ausgeschlossen werden. Auch der Zusatz von Pseudomonas Rohextrakt und damit von Wildtypenzymen konnte die Reaktion nicht in die gewünschte Richtung, den Verbrauch von Geranyl-CoA, ziehen (Daten nicht gezeigt). Eine nicht funktionstüchtige rekombinante GCase konnte also nicht ausgeschlossen werden.



Abb. 4.47.: Untersuchung des Einflusses von AtuE und AtuA auf die Reaktion der Geranyl-CoA Carboxylase Reaktion
 Mit Hilfe der Enzymassays dargestellt in [A], dem Ansatz mit 30 μl GCase (0,19 mg/ml) und in [B], dem Ansatz mit dem GCase/AtuE/AtuA Gemisch (jeweis 5 μg) konnten keine GCase Aktivitäten bestimmt werden.

4.4.2.2. Untersuchung der pJoe4036.1::atuCDEF Konstrukte

In zurückliegenden Arbeiten wurde versucht, die Gene der beiden Carboxylasen, Geranyl-CoA und Methylcrotonyl-CoA Carboxylase in *E. coli* zu klonieren. Bei der GCase wurden hierfür zunächst die für die beiden Untereinheiten codierenden Gene *atuC* und *atuF* separat amplifiziert und über eine gemeinsame Schnittstelle ligiert (pJoe4036.1::*atuCF*). Bei der MCase wurde im Gegensatz dazu zusätzlich zu den beiden Untereinheiten codierenden Sequenzen *liuB* und *liuD* auch das durch diese eingeschlossene *liuC* Gen als ganzes Fragment (*liuB-liuC-liuD*) amplifiziert (pJoe4036.1::*liuBCD*). Es konnten auch nach erfolgreicher Synthese und Aufreinigung der jeweiligen Untereinheiten für die Geranyl-CoA Carboxylase allerdings keine Aktivitäten bestimmt werden. Für die Methylcrotonyl-CoA Carboxylase dagegen konnte eine maximale Aktivität von 5300 mU/mg berechnet werden. Somit war es sowohl für die aus *P. aeruginosa* aufgereinigte (5900 mU/mg), als auch für die GCase in beiden Fällen nicht möglich.

Da die Klonierung der MCase (*liuB/liuD*) als ganzes Konstrukt von *liuBCD* erfolgreich war und das so gewonnene Protein in den sich anschließenden Untersuchungen Aktivität zeigte, wurde nun auch die GCase als zusammenhängendes Konstrukt *atuCDEF* amplifiziert und in *E. coli* kloniert (Kap.4.3.3.). Bei der Synthese der beiden Untereinheiten, oder besser der Aufreinigung dieser aus *E. coli* Rohextrakt traten jedoch Probleme auf, darin bestehend, dass das AtuC Protein, welches im Falle der GCase noch deutlich über das AtuF (C-terminale His-*Tag*) mit aufgereinigt werden konnte, hier nur in Spuren im Vergleich zum AtuF erhalten wurde (Kap.4.3.4.). Entsprechende Versuche (Optimierung der Expressionsbedingungen, Regeneration des Säulenmaterials) auch hier beide Untereinheiten zu erhalten schlugen fehl. Mit den so gewonnen Proben konnten daher auch keine Aktivitäten bei Einsatz von Geranyl-CoA bzw. Methylcrotonyl-CoA gewonnen werden (Daten nicht gezeigt).

4.4.3. Untersuchung der Carboxylasen mit Hilfe der rekombinanten Acyl-CoA Dehydrogenasen

In einem zuvor behandelten Abschnitt (Kap.4.2.) wurde bereits eine mögliche Verknüpfung von Acyl-CoA Dehydrogenase und Carboxylase Assay besprochen. In jenem Abschnitt wurden Versuche mit Wildtypenzymen aus *P. aeruginosa* unternommen. Durch die Verwendung von *E. coli* Rohextrakt (pJoe4036.1::PA2889) als Quelle der Citronellyl-CoA Dehydrogenase (AtuD) konnten dort jedoch keine Aussagen hinsichtlich der Möglichkeit der Kopplung, sowie der Aktivität der GCase in diesen Versuchen gemacht werden, da eine Absorptionsänderung auch ohne Zugabe der Carboxylase erfolgte. Da an dieser Stelle nun rekombinante Proteine zur Verfügung standen, sollten die früher gemachten Untersuchungen auch mit diesen wiederholt werden. Bei einer aktiven Citronellyl-CoA Dehydrogenase (AtuD) wird aus Citronellyl-CoA *cis*-Geranyl-CoA das Substrat der Geranyl-CoA Carboxylase bereitgestellt. Die Aktivität der rekombinanten Citronellyl-CoA Dehydrogenase ist in einem späteren Abschnitt dieser Arbeit (Kap.4.5.2.) gezeigt.

Mit Hilfe der aufgereinigten, rekombinanten Proteine AtuD (pJoe4036.1::*atuD*, pet28a::*atuD*) und GCase (pJoe4036.1::*atuCF*) wurden die Versuche zur Kopplung des Dehydrogenase und Carboxylase Assays wiederholt. Jedoch war auch hier keine Bestimmung der GCase Aktivität möglich, da NADH+H⁺ mit DCPIP_{ox} und PMS als Elektronen-Vermittler unter Reduktion von DCPIP_{ox} reagiert. Durch die Bildung von NAD⁺ und DCPIP_{red} wird die Konzentrations-abnahme von NADH+H⁺ als Absorbtionsabnahme auch bei Abwesenheit der Carboxylase im Assay sichtbar (Daten nicht gezeigt).

In folgenden Experimenten wurde daher eine Reaktion ohne PMS und DCPIP getestet, wobei es jedoch unter Verwendung der rekombinanten GCase nicht möglich war, Aktivitäten zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Die Citronellyl-CoA Dehydrogenase, aber auch die Isovaleryl-CoA Dehydrogenase des Liu-Weges sind Vertreter der Familie der Acyl-CoA Dehydrogenasen. Diese Flavoproteine, katalysieren die α,β -Dehydrogenisierung von Fettsäure-Acyl-CoA Konjugaten, wobei ein Wasserstoffatom als Proton an eine als Base wirkende Aminosäure im aktiven Zentrum des Enzyms und das zweite Wasserstoffatom als Hydrid an das FAD, die prosthetische Gruppe des Enzyms, angelagert wird (Chattopadhyay, 2007; Ghisla & Thorpe, 2004). Da bei einer Reaktion ohne PMS und DCPIP keine Oxidation des Enzymgebundenen FADHs zu FAD erfolgen kann, wäre es für das Enzym nicht möglich, ein weiteres Citronellyl-CoA Molekül zu Geranyl-CoA zu oxidieren.

Um auszuschließen, dass die fehlende Aktivität auf zu wenig "nutzbares" FAD zurückzuführen war, wurde dem "gekoppelten Ansatz" zusätzliches FAD (10 bzw.100 μ M) hinzugefügt. Aktivitäten konnten allerdings auch bei diesen Versuchen nicht bestimmt werden. Ob der Zusatz von FAD in diesen Reaktionen eine ausreichende Verfügbarkeit des Cofaktors für das rekombinante Protein AtuD darstellte, konnte nicht festgestellt werden, da eine Aktivität der rekombinant von *E. coli* synthetisierten GCase sich im Assay nicht zeigte (Abb. 4.48).



Abb. 4.48:Darstellung der gekoppelten AtuD/GCase Reaktion ohne PMS und DCPIP
Nach der Inkubation der Substanzen des Dehydrogenase-Assays (Bildung des *cis*-GCoAs), wurde
der GCase Reaktionsmix, welcher zusätzlich FAD (10 μM) enthielt, zugegeben. An dieser Stelle
konnte keine GCase Aktivität festgestellt werden.

Um auszuschließen, dass das Fehlen der GCase Aktivität (rekombinante Proteine) im Assay ohne PMS und DCPIP auf ein generelles Enzym-bedingtes Problem der GCase zurückzuführen ist, sollte auch die Kopplung der Isovaleryl-CoA Dehydrogenase und der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase, für welche schon zuvor Aktivitäten im Carboxylase Assay allein erhalten werden konnte, getestet werden.

Die entsprechenden Ansätze, welche ohne PMS und DCPIP dafür aber mit zusätzlich FAD durchgeführt wurden, brachten allerdings auch in diesem Falle keine Aktivität der MCase hervor, obwohl das aktive rekombinante Enzym (Daten nicht gezeigt) das durch die Isovaleryl-CoA Dehydrogenase Reaktion bereitgestellte MCoA hätte umsetzten müssen. Bei

den Versuchen hier konnte lediglich ein schwacher Abfall der Absorption bei Zugabe des MCase Reaktionsmixes beobachtet werden (Abb. 4.49 [A]). Dieser Abfall war jedoch nicht auf eine MCase Aktivität zurückzuführen, sondern wurde bereits durch die Zugabe des Reaktionsmixes (PEP, ATP, NADH, BSA, KHCO₃ und MgCl₂) hervorgerufen (Abb. 4.49 [B]).



Abb. 4.49: Darstellung der gekoppelten LiuA/MCase Reaktion In [A] wurde der MCase Reaktionsmix, welcher alle Komponenten des Carboxylase Assays enthält als Mischung zum vorher inkubierten Dehydrogenase Assay zugegeben. Vergleichend dazu in [B]: die Zugabe der Komponenten des Mixes einzeln zum Anzatz, Mix: PEP, ATP, NADH, BSA, KHCO₃ und MgCl₂; PK: Pyruvat Kinase; LDH: Lactat Dehydrogenase; MCase: Methylcrotonyl-CoA Carboxylase und MCoA: Methylcrotonyl-CoA.

Aufgrund des unbeabsichtigten Übertragens von Wasserstoffatomen im durchgeführten Assay (CCoA Dehydrogenase/GCase), einer damit bedingten Absorptionsabnahme ohne Zugabe an Carboxylaseenzym und einer nicht erhalten Aktivität im Assay der Isovaleryl-CoA (ICoA) Dehydrogenase/Methylcrotonyl-CoA Carboxylase ohne PMS und DCPIP muss davon ausgegangen werden, das eine Kopplung von Dehydrogenase und Carboxylase Assay auf diese Weise nicht möglich ist.

4.4.4. Versuche zur Bestimmung von Enzymaktivitäten unter Verwendung von *cis*- und *trans*-Geranyl-CoA als Substrate

Da die Versuche zur Kopplung der Enzymreaktionen von Acyl-CoA Dehydrogenase und Carboxylase in beiden Fällen, Citronellyl-CoA DH/GCase und Isovaleryl-CoA DH/MCase, keine Aktivitäten hervorbrachten und somit höchst wahrscheinlich über den hier beschriebenen Weg diese nicht möglich ist, konnte bis auf weiteres ein möglicher Einfluss des Isomerengemisches, als welches das Substrat Geranyl-CoA bis zum jetzigen Zeitpunkt vorlag, nicht ausgeschlossen werden. In einem anderen Teil dieser Arbeit (Kap.4.8.5) war es schließlich möglich die beiden Isomere der Geranylsäure auf Stufe des Methylesters über semi-präparative HPLC zu trennen. Somit lagen schließlich nach Verseifung der Ester die *cis*und die *trans*-Geranylsäure vor, welche dann als Ausgangsverbindungen für die Synthese von *cis*- und *trans*-Geranyl-CoA verwendet wurden. Mit den so synthetisierten Substraten konnten die entsprechenden Enzymreaktionen erneut durchgeführt werden. Hierfür wurden zunächst Rohextrakte von *P. aeruginosa*, welche auf verschiedenen C-Quellen angezogen wurden untersucht. Die Ergebnisse sind in der Abbildung 4.50 graphisch dargestellt. In der Abbildung 4.51 erfolgte weiterhin die vergleichende Betrachtung der Ergebnisse mit früher durchgeführten Untersuchungen.



Abb. 4.50: Vergleich der Aktivitäten mit den nun zur Verfügung stehenden Substraten *cis-* und *trans-*GCoA sowie MCoA, welche mit den unterschiedlichen Rohextrakten von *P. aeruginosa* erhalten wurden

RE Glu: Rohextrakt gewonnen von Zellen, welche mit Glukose als C-Quelle angezogen wurden; RE Iso: Rohextrakt gewonnen von Zellen, welche mit Isovaleriansäure als C-Quelle angezogen wurden; RE Cs: Rohextrakt gewonnen von Zellen, welche mit Citronellsäure als C-Quelle angezogen wurden

Vergleicht man die Aktivitäten, welchen mit Rohextrakt von mit Glukose gewachsenen Zellen erhalten wurden, so wurde ersichtlich, dass relativ ähnliche Werte bei der Verwendung der Substrate *cis*- und *trans* GCoA, aber auch mit MCoA zu beobachten waren (Abb. 4.50). Diese lagen nur geringfügig unter den Werten, welche zu Beginn der Arbeit mit der Isomerenmischung von GCoA (Mischung) und MCoA (alte Charge) erhalten wurden (Abb. 4.51 bzw. Kap. 4.2., Tab. 4.3). Da bei Wachstum von *P. aeruginosa* mit Glukose als alleinige C- und Energiequelle weder das *atu*- noch das *liu*-Gencluster und damit der Abbau von azyklischen Monoterpenen bzw. der Abbau von Leucin und Isovaleriansäure induziert werden, war hier nicht von signifikanten Aktivitäten ($A_{spz} \leq 7$ mU/mg) zu sprechen.

Vergleicht man dazu die erhalten Daten von Rohextrakt von mit Isovaleriansäure gewachsenen Zellen, so wurde deutlich dass die Aktivitäten, welche mit Isomerenreinen Substraten bzw. der Mischung an GCoA erhalten wurden, denen der entsprechenden Glukose Aktivitäten entsprachen (Bereich 3-6 mU/mg, Abb. 4.51). Eine signifikante Aktivität von diesem Rohextrakt mit *cis*-oder *trans*-GCoA konnte an dieser Stelle somit nicht festgestellt werden. Nichtsdestotrotz war die Bestimmung einer Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Aktivität möglich. Diese lag bei $20 \pm 9,6$ mU/mg (Abb. 4.50) und war damit deutlich geringer als die in früheren Messungen erhaltene Aktivität von 54 ± 22 mU/mg (Abb. 4.51, Tab. 4.3). Konnten zuvor mit Rohextrakt aus *P. aeruginosa* Zellen, welche mit Citronellsäure als alleinige C- und Energiequelle angezogen wurden, MCase Aktivitäten von ca. 47 ± 11 mU/mg erhalten werden, so fiel die Aktivität bei diesen Messungen mit ca. 12 ± 3 mU/mg deutlich geringer aus. Die erhaltene GCase Aktivität mit *cis*-GCoA (ca. 11 ± 9 mU/mg) entsprach im Vergleich dazu der Aktivität, welche schon zuvor mit der Mischung aus *cis*- und *trans*-GCoA erhalten werden konnte (11 ± 6 mU/mg, Abb. 4.51). Die berechnete Aktivität mit *trans*-GCoA war dagegen mit 5 ± 5 mU/mg etwas geringer.





RE Glu: Rohextrakt gewonnen von Zellen, welche mit Glukose als C-Quelle angezogen wurden; RE Iso: Rohextrakt gewonnen von Zellen, welche mit Isovaleriansäure als C-Quelle angezogen wurden; RE Cs: Rohextrakt gewonnen von Zellen, welche mit Citronellsäure als C-Quelle angezogen wurden

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass auch nach getrenntem Einsatz von *cis*- und *trans*-GCoA als Substrate in den Carboxylase Assay signifikante Aktivitäten, berechnet aus

den entsprechenden Absorptionsänderungen, lediglich mit MCoA erhalten werden konnten. Weder mit *cis*- noch mit *trans*-Geranyl-CoA konnten deutliche Absorptionsänderungen beobachtet und damit deutliche Aktivitäten bestimmt werden.

Folgend wurden auch Messungen zur Carboxylase Aktivität mit den rekombinanten Proteinen, welche über verschiedene Konstrukte in *E. coli* synthetisiert wurden, durchgeführt. Eine MCase Aktivität von rekombinantem Protein konnte zum Vergleich mit 928 \pm 261 mU/mg bestimmt werden. Wurden "aufgereinigte" Proteine, die über die Geranyl-CoA Carboxylase Konstrukte pJoe4036.1::*atuCF*, pJoe4036.1::*atuCDEF* und pCOLA-Duet1::*atuCF* in *E. coli* synthetisiert wurden, in die Messungen eingesetzt, so konnten im Vergleich dazu nur geringfügige Aktivitäten berechnet werden (Abb. 4.52). Im Vergleich zu der MCase Aktivität der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase lagen diese Aktivitäten hier im Bereich von unter 100 mU/mg (Tab. 4.7).



Abb. 4.52: Vergleich der Aktivitäten mit den nun zur Verfügung stehenden Substraten *cis-* und *trans*-GCoA sowie MCoA, welche mit den verschiedenen rekombinanten Proteinen aus *E. coli* erhalten wurden (MCase: pJoe::*liuBCD*; GCase: pJoe::*atuCF*, pJoe::*atuCDEF* und pCOLA::*atuCF*)

Dabei konnten mit *cis*-GCoA als Substrat Aktivitäten im Bereich von 18-26 mU/mg berechnet werden (Tab. 4.7). Von Seubert et *al.* (1963) wurde postuliert, dass die Geranyl-CoA Carboxylase das *cis*-Geranyl-CoA als Substrat umsetzt. Nichtsdestotrotz konnten für die Konstrukte pJoe4036.1::*atuCF* und pCOLA::*atuCF* mit 43 \pm 2,8 mU/mg bzw. 70 \pm 52,3 mU/mg höhere Aktivitäten mit *trans*-Geranyl-CoA bestimmt werden.

Wie auch immer, auch wenn mit den CoA-Estern jetzt sowohl *cis*-, als auch *trans*-GCoA für Messungen von Enzymaktivitäten zur Verfügung standen, so waren doch aufgrund der sehr geringen Absorptionsänderungen lediglich minimale Aktivitäten zu berechnen und damit Aussagen schwierig und nicht eindeutig. Als signifikante Aktivität kann letztendlich lediglich die MCase Aktivität des Konstruktes pJoe4036.1::*liuBCD* mit dem Substrat MCoA angesehen werden. An dieser Stelle müssen die Untersuchungen auch mit neu gewonnen Chargen an Protein wiederholt werden, um die hier erhaltenen Ergebnisse zu kontrollieren und besser interpretieren zu können.

Substrat	Spezifische Aktivität von Protein gereinigt aus <i>E. coli</i> mit den folgenden Konstrukten in mU/mg:									
	pJoe:: <i>liuBCD</i>	pJoe::atuCF	pJoe::atuCDEF	pCOLA::atuCF						
cis-GCoA	nn^1	$18,7 \pm 16,3^1$	$22,7 \pm 11,8^{1}$	$25,7 \pm 13,7^{1}$						
trans-GCoA	nn^1	$43\pm2,\!8^2$	$7\pm12,1^1$	$70 \pm 52,3^{3}$						
MCoA	928 ± 261^4	$23,5 \pm 33,2^2$	nn ²	$5 \pm 4,2^{2}$						

Tab. 4.7: Spezifische GCase und MCase Aktivitäten von aufgereinigten rekombinantem Protein

Legende: nn: Aktivität nicht nachweisbar; ¹: 3 unabhängige Messungen, ²: 2 unabhängige Messungen, ³: 4 unabhängige Messungen, ⁴: 5 unabhängige Messungen

Seit den Arbeiten von Seubert et al. (1963) ist bekannt, das lediglich das cis-Geranyl-CoA als Substrat von der Geranyl-CoA Carboxylase umgesetzt wird. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde daher vermutet, dass die fehlende GCase Aktivität auf die möglicherweise gegenseitige Beeinflussung der beiden Isomere des GCoA Substrates zurückzuführen war. Da im späteren Verlauf diese beiden Isomere getrennt zur Verfügung standen, konnte auch diese Vermutung näher untersucht werden. Bei den durchgeführten Versuchen mit Rohextrakt von P. aeruginosa Cs Zellen, bei welchem zunächst das eine und folgend das andere Isomer dem Ansatz zugesetzt wurde, konnten jedoch keine handfesten Ergebnisse erhalten werden. Durch Wiederholung von verschiedenen Ansätzen kam es zu gegensätzlichen Ergebnissen. Zum einen konnte eine "Beeinflussung" durch Abflachen der Reaktion nach Zugabe von trans-GCoA festgestellt werden, zum anderen war dies beim gleichen Ansatz wiederum nicht der Fall (Abb. 4.53). Die gleichen Resultate wurden auch bei der Reaktion von trans-GCoA mit sich anschließender Zugabe von cis-GCoA erhalten (Abb. 4.54). Eine Hemmung von cis-GCoA durch trans-GCoA und Umgekehrt eine Hemmung von trans-GCoA durch cis-GCoA konnte somit nicht eindeutig festgestellt werden. Diese kann dessen ungeachtet aufgrund der vorliegenden sehr geringen GCase Aktivitäten im Vergleich zur MCase Aktivität, sowohl von Wildtypenzym als auch von der rekombinanten MCase, allerdings auch nicht ausgeschlossen werden. Um eindeutige Aussagen treffen zu können, sind auch signifikante Absorptionsänderungen und damit zu berechnende Aktivitäten der einzelnen GCase Konstrukte und damit von rekombinanter GCase erforderlich.



Abb. 4.53: Einfluss von *trans*-GCoA auf die Reaktion von Rohextrakt von *P. aeruginosa* PAO1 Cs Zellen mit *cis*-GCoA als Substrat

In [A] bewirkt die Zugabe von *trans*-GCoA zum Ansatz ein Abflachen der Reaktion, bei welcher zuvor eine Aktivität von 17,8 mU/mg berechnet werden konnte. In [B] einem identischen Ansatz konnte nach Zugabe von *trans*-GCoA eine erhöhte Aktivität berechnet werden. Diese lag zuvor mit *cis*-GCoA bei 14,6 mU/mg und nach Zugabe von zusätzlichem *trans*-GCoA bei 20,8 mU/mg.



Abb. 4.54: Einfluss von *cis*-GCoA auf die Reaktion von Rohextrakt von *P. aeruginosa* PAO1 Cs Zellen mit *trans*-GCoA als Substrat In [A] bewirkt die Zugabe von *cis*-GCoA zum Ansatz eine Erhöhung der berechneten Aktivität

von 10 mU/mg auf 23 mU/mg. In [B] konnte durch Zugabe von *cis*-GCoA zu einem identischen Ansatz eine minimale Reduktion der Aktivität von 13 auf 11 mU/mg berechnet werden.

4.5. Klonierung und Expression von Genen des Atu-Weges - Synthese und Reinigung weiterer rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur weiteren Untersuchung der Reaktionsabfolge des *"lower atu pathways"* von der Geranyl-CoA Carboxylase über die Hydratase bis zur Lyase wurden die Gene, welche vermutlich für die Genprodukte mit entsprechender Aktivität kodieren, so in den Vektor pJoe4036.1 kloniert, dass die aufzureinigenden Proteine mit einem C-terminalen *Tag* aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten fusioniert vorlagen. Die Induktion der Überexpression erfolgte im Falle des verwendeten pJoe4036.1 Vektors über einen Rhamnosepromotor (Stumpp et *al.*, 2000). Durch die spezifische Bindung des His-*Tags* an das Material Ni-NTA Agarose konnte hier eine Aufreinigung des Proteins über eine Einschrittchromatographie erfolgen.

4.5.1. Klonierung und Expression von atuD und Reinigung des Proteins AtuD

In vorangegangenen Untersuchungen konnte durch Förster-Fromme et *al.* (2008, Chattopadhyay, 2007) gezeigt werden, das AtuD die Funktion der Citronellyl-CoA Dehydrogenase innehat und somit die Umsetzung von Citronellyl-CoA zu *cis*-Geranyl-CoA katalysiert. Da für weitere Experimente das aufgereinigte Enzym erforderlich war, sollte das Gen aus *P. aeruginosa* in *E. coli* JM109 kloniert und das Protein heterolog in diesem Stamm synthetisiert werden. Dies erfolgte auf zwei unterschiedlichen Wegen.

Zunächst wurde das Gen aus *P. aeruginosa* unter Verwendung der spezifischen Primer (PA 2889 Start, *atuD*-lowerHis) und der *Pfu*-Polymerase der Firma Genaxxon neu amplifiziert. Das erhaltene PCR-Produkt (1161 bp) wurde aufgereinigt und mit den Enzymen *Nde*I und *Bam*HI, deren Schnittstellen durch die Primer eingeführt wurden, verdaut. Nach Ligation des Fragmentes in den Vektor pJoe4036.1 (Abb. 4.55) erfolgte die Transformation in den Stamm *E. coli* JM109.



Abb. 4.55:Vektorkarte des Konstruktes pJoe4036.1::atuD_{His}Nähere Erläuterungen zur Klonierung sind im Text nachzulesen.

Weiße Klone auf den verwendeten AIX-Selektionsplatten wurden weiter untersucht und über Testverdau, Kolonie-PCR und Sequenzierung überprüft. Durch Sequenzierung mit den Primern pJOEr und T7 konnte lediglich ein Klon mit der richtigen Sequenz identifiziert werden. Dieser wurde folgend zur Identifizierung der Inkubationsbedingungen einer Testexpression unterzogen. Die Anzucht erfolgte in LB-Medium bei 30 und 37 °C in Anwesenheit von Riboflavin. Nach dem Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,3-0,5 wurde mit 0,2 % Rhamnose induziert und jede Stunde eine Probe entnommen, welche folgend mittels SDS-PAGE analysiert wurden. Dabei zeigte sich, dass die getesteten Temperaturen keinen signifikanten Unterschied in den Expressionsraten bewirkten (Daten nicht gezeigt), sodass im Folgenden die Synthese des Proteins aus P. aeruginosa in E. coli bei 30 °C erfolgte. In der Abbildung 4.56 ist das Ergebnis der Testexpression bei 30 °C dokumentiert. Es ist zu erkennen, dass im Vergleich zum leeren Vektor (E. coli JM109 pJoe4036.1) mit Hilfe des Konstrukts pJoe4036.1:: atuD im Stamm E. coli JM109 rekombinantes AtuD Protein (ca. 43 kDa) synthetisiert wurde. Eine Zunahme der Expressionsrate und somit eine Zunahme an AtuD Protein war bis nach 5 bis 6 Stunden nach Induktion zu beobachten. Somit sollte die Inkubationsdauer für folgende Experimente 6 Stunden nicht überschreiten.



Abb. 4.56: Nachweis des AtuD-Fusionsproteins in der Testexpression mittels SDS-PAGE (12 %) und Coomassie-Färbung
[A] Expression des leeren Expressionsvektors pJoe4036.1 und [B] des Konstruktes pJoe4036.1::*atuD* in *E. coli* JM109. Aufgetragen wurden jeweils 10 μl Probe.
vI: Proben vor Induktion, 1-3: Proben nach 1-3 Stunden, M: Marker, 4-8: Proben nach 4-8 Stunden

Nach Feststellung der Inkubationsbedingungen erfolgte die Expression des Konstruktes pJoe4036.1::*atuD* in *E. coli* JM109 und folgend eine Aufreinigung über das Säulenmaterial Ni-NTA Agarose. Um eine mögliche Limitation an FAD als Cofactor auszuschließen, wurden der Kultur während des Wachstums zur besseren Verfügbarkeit 1 µg/ml Riboflavin zugesetzt (persönliche Mitteilung K. Förster-Fromme). Das Ergebnis der Aufreinigung ist in der

143

Abbildung 4.57 festgehalten. An dieser Stelle war zu beobachten, dass eine Elution des Proteins von der Säule mit 100 mM Imidazol im Puffer begann und mit steigender Konzentration weiter zunahm (150 mM Imidazol), um dann mit 200 mM Imidazol im Puffer wieder abzunehmen. Die Fraktionen, in denen Protein nachgewiesen werden konnte, wurden vereinigt, umgepuffert und auf Eis bzw. bei -20 °C gelagert. Pro g Feuchtgewicht konnten dabei ca. 13 mg rekombinantes Protein aus *E. coli* gereinigt werden.





Parallel erfolgte in Zusammenarbeit mit K. Förster-Fromme die Klonierung des *atuD* Gens in den Vektor pET28a. Hierfür wurde das bereits vorhandene Konstrukt aus der laborinternen Stammsammlung (Nr.3312, ohne His-*Tag*) aus *E. coli* isoliert, und das Genfragment mit Hilfe der Schnittstellen *Nde*I und *Hind*III aus dem Vektor pJoe4036.1 herausgeschnitten. Über besagte Schnittstellen wurde das Fragment folgend in den Expressionsvektor pET28a ligiert, wodurch eine Fusion mit den N-terminalen His-*Tag* codierenden Sequenzen erreicht wurde.

Auch dieses Konstrukt wurde in den Stamm *E. coli* JM109 transformiert und mittels Testverdau und Kolonie-PCR überprüft. Positive Konstrukte wurden aus dem Stamm isoliert und in den Expressionsstamm *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS RARE transformiert. In der sich anschließenden Testexpression (Abb. 4.58) konnte eine verstärkende Expression über die Zeit nach Induktion mit 1 mM IPTG anhand der zunehmenden Bandenintensität festgestellt werden. Als Kontrolle wurde der Stamm mit dem leeren pET28a Vektor mitgeführt. Die maximale Proteinmenge konnte hier 4-5 Stunden nach Induktion erhalten werden.


Abb. 4.58:Nachweis des AtuD-Fusionsproteins in der Testexpression mittels SDS-PAGE (12 %) und
Coomassie-Färbung[A] Expression des leeren Expressionsvektors pET28a und [B] des Konstruktes pET28a::atuD in

E. coli Rosetta 2 (DE3) pLysS RARE. Aufgetragen wurden jeweils 10 µl Probe.

vI: Proben vor Induktion, 1-3: Proben nach 1-3 h, M: Marker, 4-22: Proben nach 4-22 h

Das Konstrukt wurde in einem größeren Expressionsansatz eingesetzt und das resultierende Protein über den N-terminalen His-*Tag* über Ni-NTA Agarose aufgereinigt. Das Ergebnis ist in der Abbildung 4.59 dokumentiert. Das Protein konnte an dieser Stelle mit Hilfe von 100 bzw. 150 mM Imidazol im Puffer von der Säule eluiert werden. Eine weitere Erhöhung der Imidazolkonzentration zeigte keinen Effekt. Das Protein wurde umgepuffert und wie bereits beschrieben gelagert. Unter Verwendung des pet28a::*atuD* Konstruktes war es möglich, 4 mg AtuD Protein pro g Feuchtgewicht aus dem Stamm *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS RARE zu isolieren.





Jeweils 10 µl Probe wurden in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.

RE: Rohextrakt, W1-2: Waschfraktionen (10 mM Imidazol), W3-4: Waschfraktionen (20 mM Imidazol), M: Marker, E1-E2: Elutionsfraktionen mit 50 mM Imidazol, E3-4: Elutionsfraktionen mit 100 mM Imidazol, E5-6: Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol, E7-8: Elutionsfraktionen mit 200 mM Imidazol, E9-10: Elutionsfraktionen mit 250 mM Imidazol, E11-12: Elutionsfraktionen mit 500 mM Imidazol

Für die Synthese und Aufreinigung des Proteins LiuA kam ein bereits vorhandenes Konstrukt zum Einsatz (Förster-Fromme & Jendrossek, 2008). In diesem Falle mußte lediglich das Konstrukt pET28a::*liuA* aus dem Stamm *E. coli* JM109 isoliert und in den Expressionsstamm *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS RARE transformiert werden. Nach Anzucht des Stammes in Anwesenheit von Riboflavin, Zellaufschluss und Aufreinigung des rekombinanten Proteins (Abb. 4.60) konnten pro g Feuchtgewicht ca. 45 mg Protein erhalten werden.



Abb. 4.60: Reinigung des rekombinanten Proteins LiuA über Ni-NTA Agarose nach Expression des Konstruktes pET28a::liuA in E. coli Rosetta2 (DE3) pLysS RARE
Jeweils 10 μl Probe wurden in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.
RE: Rohextrakt, W1-2: Waschfraktionen (10 mM Imidazol), W3-4: Waschfraktionen (20 mM Imidazol), M: Marker, E1-E2: Elutionsfraktionen mit 50 mM Imidazol, E3-4: Elutionsfraktionen mit 100 mM Imidazol, E5-6: Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol, E7-8: Elutionsfraktionen mit 200 mM Imidazol, E9-10: Elutionsfraktionen mit 250 mM Imidazol, E11-12: Elutionsfraktionen mit 500 mM Imidazol

4.5.2. Versuche zur Bestimmung von Enzymaktivitäten der Acyl-CoA Dehydrogenasen

In Messungen, auf welche im weiteren Verlauf dieser Arbeit näher eingegangen wird, konnte lediglich die Reaktion des AtuD Proteins mittels HPLC-(ESI)-MS Analyse bestätigt werden (Kap.4.7.2.). In diesen wurden eine Abnahme von Citronellyl-CoA und eine Zunahme von Geranyl-CoA im Ansatz bestimmt. Für den Versuch eine Kopplung von Dehydrogenase und Carboxylase Assay zu erreichen (Kap.4.2. bzw. Kap.4.4.3.), und damit gegebenenfalls ausreichend *cis*-Geranyl-CoA für die Geranyl-CoA Carboxylase als Substrat zur Verfügung zu stellen, war es zunächst erforderlich die rekombinanten Dehydrogenasen AtuD bzw. im Falle der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase LiuA zu überprüfen.

Die Klonierung der entsprechenden Gene aus dem Wildtypstamm *P. aeruginosa* bzw. die folgende Synthese und Reinigung der rekombinanten Enzyme ist im Abschnitt 4.5.1. näher dargestellt.

Für die Untersuchung der Enzymaktivitäten der Acyl-CoA Dehydrogenasen war es weiter erforderlich die entsprechenden CoA-Ester herzustellen. Citronellyl-CoA (CCoA) und Isovaleryl-CoA (ICoA) wurden nach der Methode des gemischten Anhydrids aus den entsprechenden Säuren und CoenzymA synthetisiert (Guan et *al.*, 1999; Förster-Fromme et *al.*, 2006).

Der Assay zum Verfolgen der Aktivitäten der beiden Acyl-CoA Dehydrogenasen wurde in vorangegangenen Arbeiten etabliert (Kap. 3.14.1., Chattopadhyay, 2007; Förster-Fromme et al., 2008; Förster-Fromme & Jendrossek, 2008). Bei der Umsetzung von Citronellyl-CoA zu Geranyl-CoA (bzw. Isovaleryl-CoA zu Methylcrotonyl-CoA) übernimmt das Enzym AtuD (bzw. LiuA) zwei Wasserstoffatome, die bei der Regeneration der prosthetischen Gruppe FAD an den Mediator PMS weitergegeben werden. Das so reduzierte PMS wird durch diese Weitergabe der Wasserstoffatome an den Elektronenakzeptor DCPIPox im Ansatz oxidiert. DCPIP_{ox} ist blau und absorbiert bei einer Wellenlänge von 600 nm. Durch die Aufnahme der Wasserstoffatome vom PMS wird das DCPIPox zu DCPIPred reduziert und somit farblos. Die Absorptionsabnahme kann auf diese Weise photometrisch verfolgt werden (Chattopadhyay, 2007). Die bei der Überprüfung der Dehydrogenasen erhaltenen Ergebnisse sind in dem folgenden Diagramm graphisch dargestellt (Abb. 4.61). Bei den Messungen mit LiuA und somit die Umsetzung von Isovaleryl-CoA zu Methylcrotonyl-CoA wurde den Ansätzen im Gegensatz zu den anderen Proben 10 µM FAD zugesetzt (aufgrund der persönlichen Mitteilung von K. Förster-Fromme). Der Rohextrakt der Kulturen des leeren pET-Vektors zeigte weder mit CCoA noch mit ICoA eine Aktivität. Für LiuA konnte eine spezifische Aktivität mit ICoA bestimmt werden, welche bei aufgereinigtem Protein bei 1170 \pm 78,9 mU/mg und bei Rohextrakt bei 576 ± 9,9 mU/mg lag. Eine Aktivität des Proteins mit CCoA konnte lediglich mit 30 ± 9.3 mU/mg berechnet werden. Eine spezifische Aktivität für AtuD wurde mit CCoA bestimmt. Diese lag mit aufgereinigtem Protein mit 222 ± 7.8 mU/mg etwas höher, als bei Verwendung des entsprechenden Rohextraktes (153 ± 1,7 mU/mg). Durch Zugabe von 10 µM FAD zum Ansatz mit aufgereinigtem AtuD Protein konnte ca. eine Verdopplung der Aktivität erreicht werden ($464 \pm 9.9 \text{ mU/mg}$). Eine Aktivität von AtuD mit ICoA als Substrat konnte nicht festgestellt werden. Der Einsatz von Rohextrakt des leeren pJoe4036.1 Vektors zeigte keine Aktivität mit CCoA. Vergleichend dazu konnte mit dem entsprechenden AtuD Rohextrakt eine Aktivität von 137 ± 40,9 mU/mg bzw. mit dem aufgereinigtem Protein eine Aktivität von 387 ± 29.8 mU/mg erhalten werden.



<sup>Abb. 4.61: Bestimmung der spezifischen Aktivitäten der Proteine AtuD und LiuA mit Citronellyl-CoA (CCoA) und Isovaleryl-CoA (ICoA) als Substrat
RE pet28a: Rohextrakt</sup> *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS RARE pet28a, RE LiuA: Rohextrakt *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS RARE pet28a::*liuA*, Protein LiuA: Protein aufgereinigt aus entsprechendem Rohextrakt, RE AtuD: Rohextrakt *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS RARE pet28a::*atuD*, Protein AtuD: Protein aufgereinigt aus entsprechenden Rohextrakt, RE pJoe: Rohextrakt *E. coli* JM109 pJoe4036.1, RE AtuD: Rohextrakt *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*atuD*, Protein AtuD: aufgereinigtes Protein aus entsprechendem Rohestrakt

Bei Versuchen von K. Förster-Fromme mit dem Protein LiuA wurde deutlich, aufgrund einer fehlenden bzw. "schlechten" Aktivität vergleichend zum Rohextrakt, dass nicht genug Cofactor in *E. coli* gebildet wurde. Durch Zugabe von zusätzlichem FAD zum Ansatz konnte eine entsprechende Aktivität des Enzyms bestimmt werden (persönliche Mitteilung). In den Versuchen hier zeigte sich, dass die Zugabe von FAD zum Reaktionsansatz auch mit AtuD einen Effekt bewirkte. Diese Tatsache sollte bei weiterführenden Untersuchen der Acyl-CoA Dehydrogenasen berücksichtigt werden. Eine nähere Charakterisierung der beiden Enzyme Citronellyl-CoA und Isovaleryl-CoA Dehydrogenase wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. An diesem Punkt war das Beobachten der spezifischen Aktivitäten vom LiuA mit Isovaleryl-CoA (ICoA) und AtuD mit Citronellyl-CoA (CCoA) ausreichend.

Die Charakterisierung der Proteine erfolgte durch Förster-Fromme et *al.* (2008) bzw. Förster-Fromme & Jendrossek (2008). In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, das aufgereinigtes AtuD Citronellyl-CoA Dehydrogenase Aktivität besitzt (V_{max} 850 mU mg⁻¹) und eine hohe Affinität zum Citronellyl-CoA (K_m 1.6 μ M) aufweist. Inaktiv dagegen war AtuD mit Octanoyl-CoA, 5-Methylhex-4-enoyl-CoA und Isovaleryl-CoA (Förster-Fromme et *al.*, 2008). Für aufgereinigtes LiuA Protein konnte eine Acyl-CoA Aktivität mit Isovaleryl-CoA (V_{max} 1600 mU mg⁻¹, K_m 2,3 μ M) gezeigt werden. Während andere Acyl-CoA Substrate, wie Isobutyryl-CoA, 3-Hydroxybutyryl-CoA, Octanoyl-CoA, Citronellyl-CoA oder 5-Methylhex-4-enoyl-CoA nicht umgesetzt wurden, konnte auch ein Umsatz von Butyryl-CoA festgestellt werden. Diese Aktivität entsprach aber lediglich 41 % vergleichend mit der Aktivität, welche mit Isovaleryl-CoA erhalten wurde (Förster-Fromme & Jendrossek, 2008).

4.5.3. Klonierung und Expression von atuE und Reinigung des Proteins AtuE

Das *atuE* Gen wurde aus der genomischen DNA von *P. aeruginosa* mit den in Tabelle 3.4 angegebenen spezifischen Primern, in deren Sequenzen zusätzlich Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Nde*I und *Bam*HI für die spätere Klonierung eingefügt wurden, amplifiziert. Nach Aufreinigung schloss sich eine Restriktion der PCR-Produkte und des Vektors pJoe4036.1 mit *Nde*I und *Bam*HI an. Die so erhaltenen Fragmente wurden mit dem verdauten Vektor ligiert und in den Stamm *E. coli* JM109 transformiert (Abb. 4.62). Die Kontrolle von zunächst positiven Kandidaten auf AIX-Selektionsplatten erfolgte über Testverdau und Kolonie-PCR. Die resultierenden Plasmide wurden anschließend sequenziert, um den korrekten Einbau des Gens in den Vektor zu bestätigen.



Abb. 4.62: Vektorkarte des Konstruktes pJoe4036.1::*atuE*_{His} Nach Amplifizierung des Fragmentes *atuE* mit den Primern *atuE*_upper und *atuE*_lower, wird nach Verdau und Ligation mit dem Vektor pJoe4036.1 über die Schnittstellen *Nde*I und *Bam*HI das Konstrukt pJoe4036.1::*atuE* erhalten. Nach Synthese von rekombinantem Protein trägt das AtuE den C-terminalen His-*Tag*.

Folgend wurden zwei positive Kandidaten zunächst mittels einer Testexpression untersucht. In dem mit Coomassie angefärbten SDS-Polyacrylamidgel des Stammes *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*atuE*/Klon 2 (Abb. 4.63 [B]) war deutlich eine Zunahme der Proteinmenge über die Zeit nach Induktion mit 0,2 % Rhamnose im Vergleich zum Zeitpunkt vor der Induktion zu erkennen. In der Kontrolle, dem Stamm *E. coli* JM109 pJoe4036.1, ist vergleichend zum rekombinanten *E. coli* Stamm keine Zunahme der Proteinbandenintensität in diesem Größenbereich zu beobachten (Abb. 4.63 [A]). Die gebildete Proteinmenge an AtuE (ca 27 kDa) war ca. 5-6 Stunden nach der Induktion am größten. Infolgedessen sollte die Inkubationszeit bei einer Überexpression in diesem Zeitrahmen liegen, um möglicht viel rekombinantes Protein zu erhalten.





Im Anschluss an die Testexpression erfolgte die Überexpression von *atuE*. Diese Überexpression, sowie der Zellaufschluss und die Reinigung des Proteins über Ni-NTA Agarose wurde, wie im Abschnitt 3.10. beschrieben, durchgeführt, wobei die Reinigung sowohl über *Gravi-Flow* Säulchen (Qiagen GmbH, Hilden) als auch unter Verwendung der FPLC-Anlage ÄKTA Purifier (Amersham Biosciences/GE Healthcare Europe GmbH, München) erfolgte. Die Ergebnisse der Aufreinigung über ein *Gravi-Flow* Säulchen sind in der Abbildung 4.64 dargestellt. Deutlich zu erkennen war, dass eine Elution des Proteins von der Säule schon mit 50 mM Imidazol im Puffer möglich war. Mit 100 mM Imidazol im Puffer war die Menge an eluiertem Protein maximal und nahm dann mit 150 mM Imidazol im Puffer wieder ab. Um einen störenden Einfluss des Imidazols auszuschließen wurden die entsprechenden Elutionsfraktionen vereinigt und umgepuffert. Die Lagerung erfolgte auf Eis im Kühlraum bzw. aliquotiert bei -20 °C. Pro g Feuchtgewicht konnten dabei ca.7 mg an rekombinantem Protein isoliert werden.



Abb. 4.64: Reinigung des rekombinanten Proteins AtuE über Ni-NTA Agarose Jeweils 10 μl Probe wurden in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht.
RE: Rohextrakt, DF: Durchfluss, W1-2: Waschfraktionen (10 mM Imidazol), W3-4: Waschfraktionen (20 mM Imidazol), M: Marker, E1-E2: Elutionsfraktionen mit 50 mM Imidazol, E3-4: Elutionsfraktionen mit 100 mM Imidazol, E5-6: Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol, E7-8: Elutionsfraktionen mit 200 mM Imidazol, E9-10: Elutionsfraktionen mit 250 mM Imidazol, E11-12: Elutionsfraktionen mit 500 mM Imidazol

4.5.4. Versuche zur Bestimmung der Enzymaktivitäten der Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase

 α , β -ungesättigte Thioester weisen eine charakteristische Absorptionsbande mit einem Maximum im Bereich von 263-266 nm auf. Durch Anlagerung von Wasser an die Doppelbindung kommt es zum Verschwinden dieser charakteristischen Absorptionsbande und ein Verfolgen der Reaktion der Hydratase mit dem Isohexenyl-glutaconyl-CoA als Substrat wird ermöglicht (Seubert & Fass, 1964a). Auf diese Weise sollte eine optische Aktivitätsbestimmung der Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase durchgeführt werden.

4.5.4.1. Untersuchung der Hydratase über Kopplung der Reaktion mit der GCase Reaktion

Für die Messung der Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase Aktivität wurde zunächst der Assay nach Seubert & Fass (1964a) etwas modifiziert. Bei den Autoren wurde als erstes der Carboxylase Assay vorinkubiert, um das Substrat der Hydratase zu generieren, und die Reaktion folgend durch Zugabe des Enzyms gestartet.

In der vorliegenden Arbeit wurde dementsprechend auch der Ansatz des Geranyl-CoA Carboxylase Assays zusammenpipettiert und mit GCoA, wie im Abschnitt 3.14.3.1. beschrieben, gestartet. Das Hydratase Enzym, welches das durch die GCase theoretisch gebildete Isohexenyl-glutaconyl-CoA weiter umsetzen sollte, wurde dem Ansatz nach einer Inkubation von 15 min bei RT zugegeben und die Reaktion bei 285 nm verfolgt. Bei Einsatz von *P. aeruginosa* Rohextrakt (Cs Zellen) als Quelle der GCase Aktivität und rekombinantem AtuE Protein, aufgereinigt aus dem entsprechenden *E. coli* Rohextrakt, konnten allerdings keine Aktivitäten der Hydratase festgestellt werden (Abb. 4.65).



Abb. 4.65: Messung der Hydratase Aktivität über einen Assay modifiziert nach Seubert & Fass, 1964a Rohextrakt von *P. aeruginosa* Cs Zellen wurde zuvor mit GCoA und den übrigen Komponenten des Carboxylase-Assays für 15 min inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von AtuE bzw. zusätzlichem GCoA. Eine Aktivität konnte hier nicht festgestellt werden.

Da jedoch unklar blieb, ob die Aktivität der GCase für die Umsetzung des Geranyl-CoA Substrates zum Substrat der Hydratase dem Isohexenyl-glutaconyl-CoA in diesem Zeitrahmen ausreichend war, wurden auch Reaktionen über Nacht angesetzt. In diesen Ansätzen erfolgte die Zugabe und das Mischen aller Komponenten ohne vorherige Inkubation. In diesem Fall konnte ein Abfall der Absorption nach ca. 500 min beobachtet werden. Folgend wurden die Messungen wiederholt, wobei auch Reaktionen ohne Hydratase Enzym angesetzt wurde.

Die erhaltenen Ergebnisse sind in der Abbildung 4.66 dargestellt. Wieder konnte eine Abnahme der Absorption im Ansatz mit allen Komponenten beobachtet werden (Abb. 4.66 [B]). Da dieser Abfall der Absorption aber auch in Ansätzen ohne Hydratase Enzym erhalten wurde (Abb. 4.66 [A]), ist der Nachweis einer Enzymaktivität der Hydratase unter diesen Bedingungen unwahrscheinlich. Da nicht gewährleistet werden konnte, dass durch die Reaktion des *P. aeruginosa* Rohextraktes auch ausreichend Isohexenyl-glutaconyl-CoA als Substrat zur Verfügung stand, kann eine Aktivität der Hydratase mit Isohexenyl-glutaconyl-CoA an dieser Stelle allerdings nicht ausgeschlossen werden.



Abb. 4.66: Messung der Hydratase Aktivität über einen Assay modifiziert nach Seubert & Fass. 1964a In [A] ist die Reaktion ohne die Hydratase AtuE im Ansatz und in [B] die Reaktion mit Zugabe von 17 µg AtuE zum Ansatz dargestellt. Alle Komponenten des Assays wurden zusammengegeben, gemischt und die Reaktion am Photometer über Nacht bei einer Wellenlänge von 285 nm verfolgt. Der Abfall der Extinktion resultierte bei diesen Versuchen jedoch nicht durch eine Aktivität derHydratase.

4.5.4.2. Untersuchung der Hydratase mit Hilfe des synthetisierten Substrates Isohexenyl-glutaconyl-CoA

Die Ausgangsverbindung für die Synthese des Isohexenyl-glutaconyl-CoAs (IHG-CoA) stand zum Ende der praktischen Arbeiten aufgrund der chemischen Arbeiten am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart zur Verfügung. Somit konnte das benötigte Substrat der Hydratase synthetisiert und direkt in die entsprechenden Reaktionen eingesetzt werden. Diese Reaktionen wurden, wie im Abschnitt 3.14.3.2. beschrieben, durchgeführt und ein möglicher Umsatz am Photometer bei einer Wellenlänge von 285 nm verfolgt. Eine Absorptionsabnahme bedingt durch die Aktivität der Hydratase mit dem Substrat IHG-CoA konnte jedoch bei diesen Reaktionen nicht festgestellt werden (Abb. 4.67).



Abb. 4.67: Direkte Messung der Hydratase Aktivität mit Isohexenyl-glutaconyl-CoA (IHG-CoA) als Substrat (modifziert nach Seubert & Fass, 1964a) Rekombinantes Enzym, welches aus *E. coli* aufgereinigt wurde, wurde in den Assay vergleichend zu Seubert & Fass (1964a) eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von IHG-CoA gestartet. Eine Aktivität konnte hier jedoch nicht festgestellt werden.

Auch der Einsatz von *P. aeruginosa* Rohextrakt (Cs Zellen) als Quelle der Wildtyp-Hydratase brachte nicht das gewünschte Ergebnis (Abb. 4.68). Somit konnte weder mit Wildtyp-Enzym noch mit rekombinanten und aufgereinigtem AtuE Protein aus *E. coli* an dieser Stelle eine Hydratase Aktivität gezeigt werden.



Abb. 4.68:Direkte Messung der Hydratase Aktivität (Wildtypenzym) mit Isohexenyl-glutaconyl-CoA
(IHG-CoA) als Substrat (modifiziert nach Seubert & Fass, 1964a)
Wildtypenzym aus Rohextrakt von P. aeruginosa (Cs Zellen), wurde in den Assay vergleichend
zu Seubert & Fass (1964a) eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von IHG-CoA gestartet.
Auch durch Zugabe von zusätzlichem Substrat und Rohextrakt konnte keine Aktivität erhalten

4.5.4.3. Untersuchung der Hydratase analog zu Feil (2006, modifiziert)

werden.

In der Arbeit von Feil (2006) wurde die Aktivität einer (E)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase bestimmt. Der Testansatz enthielt neben dem Protein lediglich das Substrat in 50 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,2. In den letzten Versuchen, die an dieser Stelle aus zeitlichen Gründen noch möglich waren, wurden nun verschiedene Puffer für die Messung einer Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase Aktivität getestet. Hierfür standen 50 mM Kaliumphosphatpuffer und Tris HCl Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten (7; 7,5 und 8,0) zur Verfügung. Isohexenyl-glutaconyl-CoA wurde in Puffer gelöst (0,1 mM) und die Reaktion durch die Zugabe der Hydratase gestartet. Dabei stellte sich heraus, dass bei der hier untersuchten Hydratase Kaliumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,5 und 8 für das Verfolgen der Reaktion nicht geeignet war (Daten nicht gezeigt). Bei Verwendung dieser Puffer kam es zum Ausfallen von Komponenten und somit zum Stören des Assays. Wurde Kaliumphosphatpuffer pH 7 in die Reaktion eingesetzt, so fielen zwar keine Komponenten des Ansatzes aus, es konnte jedoch auch keine Abnahme der Absorption in diesen Fällen beobachtet werden. Auch bei der Verwendung von Tris HCl Puffer mit den pH-Werten 7 bzw. 7,5 und 8 konnten keine Hydratase Aktivitäten mit Hilfe dieses Assays bestimmt werden (Daten nicht gezeigt).

Da für das Variieren von Komponenten bzw. das Optimieren der Enzym-Assays keine Zeit mehr zur Verfügung stand, kann hier eine Aktivität des Wildtypenzyms bzw. des rekombinanten Proteins AtuE nicht ausgeschlossen werden. Weitere Untersuchungen sind im Rahmen nachfolgender Arbeiten somit unentbehrlich.

4.5.5. Klonierung und Expression von atuA und Reinigung des Proteins AtuA

Die Synthese des Proteins AtuA wurde in vorangegangenen Arbeiten nur in Kulturen festgestellt, welche Citronellol bzw. Citronellat als C-Quelle enthielten (Förster-Fromme et *al.*, 2006). Mit Hilfe einer Insertionsmutante (ins:*atuA*) konnte weiterhin festgestellt werden, dass das Protein essentiell für diesen Abbauweg ist. Während für die anderen Genprodukte des Clusters über Datenbankrecherche Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen bestimmt wurden, und somit mögliche Funktionen im Stoffwechselweg postuliert werden konnten, war dies für AtuA nicht der Fall. Hier konnten keine Ähnlichkeiten zu Proteinen bekannter Funktion festgestellt werden, sodass unklar war, welche Funktion es im Atu-Stoffwechsel inne hat. Vergleicht man die Gene des *atu-*Clusters mit den möglichen Enzymfunktionen, die für den Ablauf des postulierten Terpenabbaus (Seubert & Fass, 1964b) erforderlich sind, so konnte lediglich die Funktion der 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase (HHG-CoA Lyase) nicht durch ein Gen besetzt werden. Für mögliche nähere Untersuchungen zur Funktion des Proteins AtuA war somit eine Gewinnung von größeren Mengen an sauberem Protein erforderlich.

Um dies zu ermöglichen, erfolgte zunächst die Amplifizierung des *atuA* Gens aus *P. aeruginosa* mit spezifisch abgeleiteten Primern (*atuA*-upper, *atuA*-lower). Für die Klonierung wurden in deren Sequenzen zusätzlich Schnittstellen für die Enzyme *NdeI* bzw. *Bam*HI eingefügt. Unter Verwendung des FastStart High Fidelity PCR Systems der Firma Roche konnte ein Produkt in der PCR-Reaktion erhalten werden (1803 bp), welches aufgereinigt und wie der isolierte und aufgereinigte Vektor pJoe4036.1 mit *NdeI* und *Bam*HI verdaut wurde (Daten nicht gezeigt). Nach anschließender Ligation und Transformation des Konstruktes in den Stamm *E. coli* JM109 erfolgte die Kontrolle von positiven Kandidaten (Daten nicht gezeigt). Zwei positive Klone wurden sequenziert. Hierbei stellte sich in der ersten Sequenzierrunde heraus, dass Klon1 Mutationen im hinteren Teil und Klon2 Mutationen im vorderen Teil der Sequenz aufwiesen. Daher wurde eine weitere Schnittstelle in der *atuA*-Sequenz gesucht und gefunden (*Fse*I), über welche eine Ligation der beiden richtigen Sequenzteile erfolgen konnte. Die Konstrukte aus Klon1 und 2 wurden isoliert und

zunächst mit den Enzymen NdeI und BamHI und folgend mit FseI geschnitten. Die entsprechenden Fragmente (Klon1: 1261bp; Klon2: 542bp) wurden aus einem 1 %igen Agarose Gel ausgeschnitten und aufgereinigt. Im anschließenden Schritt wurden zunächst beide Fragmente miteinander und folgend mit dem Vektor pJoe4036.1 ligiert. Die Transformation erfolgte wiederum in den Stamm *E. coli* JM109. Weiße Kolonien auf AIX-Platten wurden gepickt und weiter über Kolonie-PCR und Testverdau untersucht. Bei der sich anschließenden Sequenzierung positiver Klone musste jedoch festgestellt werden, dass im mittleren Teil der Gensequenz, welche zuvor aufgrund der Genlänge nicht sequenziert wurde (interner Primer *atuA*_Ls1 nötig) weitere Mutationen auftraten, welche Auswirkungen auf die Proteinsequenz zeigten. Diese *atuA* Klone konnten somit nicht weiter verwendet werden.

Parallel zu diesen Versuchen wurde weiterhin versucht das *atuA* Genfragment aus der Wilttyp-Sequenz zu isolieren. Zur erneuten Amplifizierung des Gens wurden verschieden Polymerasen (*Pfu*- bzw. *Pwo*-Polymerase von Genaxxon, Phusion Hot Start Polymerase von NEB, *Pwo*-Polymerase von PeQLab) getestet. Es konnte jedoch bei Verwendung dieser kein Produkt erhalten werden. Auch veränderte Reaktionsbedingungen wie Temperatur und unterschiedliche Konzentrationen an Mg²⁺ Ionen im Ansatz zeigten keinen Erfolg (Daten nicht gezeigt). Erst bei der Verwendung einer neuen Polymerase (PrimeSTAR[™]HS DNA Polymerase) der Firma TaKaRa (über Lonza), konnte wieder ein Produkt der richtigen Größe (1803bp) amplifiziert werden. Das Fragment wurde folgend aufgereinigt und mit den Enzymen *Nde*I und *Bam*HI verdaut, in den Vektor pJoe4036.1 kloniert (Abb. 4.69) und anschließend in den *E. coli* Stamm JM109 transformiert. Erhaltene Klone wurden wiederum über Testverdau, Kolonie-PCR und Sequenzierung getestet. Die überlappende Sequenzierung mit allen drei Primern zeigte, dass zwei der untersuchten Klone keine Mutation in der Sequenz aufwiesen. Ein dritter Klon zeigte dagegen eine Einzelmutation, welche jedoch keinen Effekt auf die Proteinsequenz hatte (Daten nicht gezeigt).



Abb. 4.69:Vektorkarte des Konstruktes pJoe4036.1::atuA_{His}
Nähere Erläuterungen zur Klonierung sind im Text nachzulesen.

Die drei positiven Kandidaten wurden dann einer Testexpression unterzogen. Die Anzucht der Kulturen erfolgte bei 30 °C in LB-Medium. Bei einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 wurde die Expression mit 0,2 % Rhamnose induziert. Jede Stunde wurden zur Kontrolle der Expression Proben entnommen. Das Ergebnis der stündlichen Probenahme ist in der Abbildung 4.70 an Hand des Beispiels für *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*atuA* KlonN1 dargestellt. Im Vergleich zum *E. coli* Stamm mit dem leeren pJoe4036.1 Vektor war deutlich eine Zunahme des Levels an Protein AtuA (ca 65 kDa) in *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*atuA* KlonN1 zu erkennen.



Abb. 4.70: Nachweis des AtuA-Fusionsproteins des Stammes *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*atuA*N1 in der Testexpression mittels SDS-PAGE (12 %) und Coomassie-Färbung
[A] Expression des leeren Expressionsvektors pJoe4036.1 und [B] des Konstruktes pJoe4036.1::*atuA* in *E. coli* JM109. Aufgetragen wurden jeweils 10 μl Probe.
vI: Proben vor Induktion, 1-4: Proben nach 1-4 h, M: Marker, 5-23: Proben nach 5-23 h

Nach der Synthese von rekombinantem AtuA im Stamm *E. coli* JM109 war die Aufreinigung über Affinitätschromatographie möglich. Neben einem *Gravi-Flow* Säulchen (Qiagen GmbH, Hilden) kam für dieses Protein auch die FPLC-Anlage ÄKTA Purifier (Amersham Biosciences/GE Healthcare Europe GmbH, München) zur Anwendung. Für die Dokumentation ist in der Abbildung 4.71 das Ergebnis der Aufreinigung im kleinen Maßstab über das *Gravi-Flow* Säulchen dargestellt. Die Elution des Proteins von der Säule war mit 100 mM Imidazol im Puffer möglich. Mit 50 bzw.150 mM Imidazol im Puffer war die Menge an eluiertem Protein deutlich geringer. Hier muss festgehalten werden, dass neben dem gewünschten Protein auch Spuren von anderen Proteinen mit von der Säule eluierten (Spur E1-3). Die Proteinhaltigen Fraktionen wurden umgepuffert und auf Eis bzw. bei -20 °C gelagert. Das rekombinante Protein konnte mit ca. 6 mg pro g Feuchtgewicht aus *E. coli* gereinigt werden.



Abb. 4.71: Reinigung des rekombinanten Proteins AtuA über Ni-NTA Agarose Jeweils 10 μl Probe wurden in einem 12 %igem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. RE: Rohextrakt, W1-2: Waschfraktionen (10 mM Imidazol), W3-4: Waschfraktionen (20 mM Imidazol), M: Marker, E1-E2: Elutionsfraktionen mit 50 mM Imidazol, E3-4: Elutionsfraktionen mit 100 mM Imidazol, E5-6: Elutionsfraktionen mit 150 mM Imidazol, E7-8: Elutionsfraktionen mit 200 mM Imidazol, E9-10: Elutionsfraktionen mit 250 mM Imidazol, E11-12: Elutionsfraktionen mit 500 mM Imidazol

4.5.6. Versuche zur Bestimmung einer möglichen Lyase Aktivität

Da im Verlauf der vorliegenden Arbeit keine aktive Geranyl-CoA Carboxylase bereitgestellt werden konnte, war es nicht möglich über die Enzymabfolge des *"lower atu pathways*" das Substrat für die 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase zu generieren. Auch eine Umsetzung von Isohexenyl-glutaconyl-CoA über die Hydratase-Reaktion zum gewünschten Edukt der Lyase war im Verlauf dieser Arbeit noch nicht möglich. Da aufgrund der fehlenden Zeit auch die Darstellung der entsprechenden Vorstufe in der Organischen

Chemie nicht weiter verfolgt werden konnte, waren Versuche zur Klärung der Funktion des AtuA Proteins als mögliche Lyase des Atu-Weges nicht möglich.

4.5.7. Klonierung und Expession von liuE und Aufreinigung des Proteins LiuE

Zum Zeitpunkt, da das Substrat der Lyase des Atu-Weges (3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA) zur Verfügung stehen würde, wäre eine Kontrolle der Lyase-Reaktion nötig. Als diese würde die Reaktion der Lyase des Liu-Weges, die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Lyase dienen, da hier das Substrat 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA kommerziell erhältlich ist. Auch in Hinblick der vergleichenden Betrachtung als zwei unterschiedliche Enzyme, aber auch bei der Annahme die Enzymfunktionen würden von ein und demselben Enzym ausgeführt, wäre das aufgereinigte Protein LiuE als 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Lyase erforderlich.

Somit wurde auch das Gen *liuE* aus *P. aeruginosa* mittels PCR amplifiziert und aufgereinigt. Das Fragment mit einer Größe von 903 bp wurde folgend mit den Enzymen *Nde*I und *Bam*HI verdaut und mit dem Vektor pJoe4036.1 ligiert. Das Konstrukt welches somit am C-terminalen Ende des Genfragmentes einen His-*Tag* codiert (Abb. 4.72), wurde folgend in den Stamm *E. coli* JM109 transformiert. Erhaltene Klone wurden dann mittels Kolonie-PCR, Testverdau und Sequenzierung überprüft. Alle drei in der Sequenzierung überprüften Klone konnten dabei als positiv identifiziert werden.



Abb. 4.72: Vektorkarte des Konstruktes pJoe4036.1::*liuE*_{His} Nach Amplifizierung des Fragmentes *liuE* mit den Primern *liuE*_upper und *liuE_Bam*HI_lower, wird nach Verdau und Ligation mit dem Vektor pJoe4036.1 über die Schnittstellen *Nde*I und *Bam*HI das Konstrukt pJoe4036.1::*liuE* erhalten. Nach Synthese von rekombinantem Protein trägt das LiuE den C-terminalen His-*Tag*.

In einer Testexpression, deren Ergebnis in der Abbildung 4.73 dargestellt ist, wurde das Expressionslevel des Konstruktes überprüft. Die Inkubationsdauer nach der Induktion wurde für kommende Expressionen auf 5-6 Stunden festgelegt, da eine längere Inkubationszeit, wie in der Abbildung 4.73 ersichtlich, keine Zunahme der Proteinmenge mehr zur Folge hatte.



Abb. 4.73: Nachweis des LiuE-Fusionsproteins in der Testexpression mittels SDS-PAGE (12 %) und Coomassie-Färbung
[A] Expression des leeren Expressionsvektors pJoe4036.1 und [B] des Konstruktes pJoe4036.1::*liuE* in *E. coli* JM109. Aufgetragen wurden jeweils 10 μl Probe.
vI: Proben vor Induktion, 1-3: Proben nach 1-3 h, M: Marker, 4-23: Proben nach 4-23 h

Zur Synthese von Protein wurde der Stamm *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*liuE* in einem größeren Maßstab angezogen. Eine Aufreinigung des Proteins aus dem erhaltenen Rohextrakt über Ni-NTA Agarose erfolgte über ein *Gravi-Flow* Säulchen (Abb. 4.74), wobei zusätzlich zum gewünschten auch weitere Proteine von der Säule eluiert wurden. Dies war vor allem in den ersten Elutionsfraktionen mit 50 mM Imidazol im Puffer (Abb. 4.74, Spur E1/2) der Fall. In den folgenden Elutionsfraktionen nahm der Anteil an unspezifischem Protein weiter ab und ab der Elutionsfraktion E5 war im Vergleich zur gewünschten Proteinbande des LiuE Proteins die Konzentration der Nebenbanden vernachlässigbar gering (Abb. 4.74, Spur E5-E10).





4.6. Kristallisation der Hydratase AtuE und der möglichen Lyase AtuA

Während für LiuE bereits die Aktivität der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Lyase gezeigt werden konnte (Chavez-Aviles et *al.*, 2009), wird von der Arbeitsgruppe Jendrossek für das AtuA die Funktion der 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase angenommen. Von der Arbeitgruppe um Campos-García wurde dagegen vermutet, dass das LiuE als Lyase des Liu-Weges auch die Funktionen im Atu-Weg ausüben könnte (Aguilar et *al.*, 2006; Chavez-Aviles et *al.*, 2009; Chavez-Aviles et *al.*, 2010). In der Veröffentlichung von 2010 konnte die Arbeitsgruppe nun eine bifunktionale Rolle des LiuE Proteins zeigen (Chavez-Aviles et *al.*, 2010). Nichtsdestotrotz konnte eine Aktivität von AtuA als 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase noch nicht ausgeschlossen werden.

Um beide Proteine hinsichtlich ihrer Struktur weiter untersuchen zu können, wurden Kristallisationsversuche mit AtuA mit Hilfe der Cooperationsgruppe an der Uni Freiburg (Prof. Einsle) durchgeführt. Des Weiteren sollte auch die Struktur des Proteins AtuE aufgeklärt werden. Kristallisationsversuche für dieses Protein erfolgten im Labor von Dr. Papageorgiou (Universität von Turku, Finnland).

Für die Versuche der Kristallisation der beiden Proteine AtuA und AtuE waren zunächst große Mengen an Protein erforderlich. Diese wurden über die rekombinanten Proteine aus *E. coli* wie bereits beschrieben (Kap.4.5.5. und 4.5.7.) gewonnen. Die Aufreinigung über Ni-NTA Agarose in diesem Maßstab erfolgte unter Verwendung der FPLC-Anlage ÄKTA

Purifier (Amersham Biosciences/GE Healthcare Europe GmbH, München). Nach Poolen und Umpuffern der Proben erfolgte das Aufkonzentrieren der Proteinlösungen über eine Amicon[®]-Zelle (Millipore GmbH, Schwalbach) und Flachmembranen aus regenerierter Zellulose (YM10-Membran) entsprechenden Durchmessers (Millipore GmbH, Schwalbach). Pro g Feuchtgewicht Zellen konnten dabei ca 5,7 mg AtuA Protein aus *E. coli* gereinigt werden. Die Menge an AtuE Protein lag bei ca. 4,5 mg pro g Feuchtgewicht Zellen. Die Proteinlösungen wurden folgend aliquotiert und an die entsprechenden Cooperationsgruppen verschickt. Für AtuE konnte kürzlich die Struktur mit einer Auflösung von 2,3 Å gelöst werden, wobei diese der Struktur von Enoyl-CoA Hydratasen entspricht (persönliche Mitteilung Dr. Papageorgiou). Für das Protein AtuA konnten dagegen bis zum jetzigen Zeitpunkt noch keine stabilen Kristalle erhalten werden, so dass entsprechende Ergebnisse noch ausstehen.

4.7. Untersuchungen der Enzymreaktionen mittels HPLC

Des Weiteren wurden im Verlauf dieser Arbeit Versuche mittels HPLC Analyse unternommen.

4.7.1. Trennung verschiedener CoA-Estern mittels HPLC

Zunächst sollte ein Programm gefunden werden, welches eine Trennung der zur Verfügung stehenden CoA-Ester zu ihrer möglichen Unterscheidung in zu untersuchenden Reaktionsansätzen ermöglichte. In einer späteren Analyse sollte es dann möglich sein, entsprechende Peaks, welche aus dem Chromatogramm verschwinden bzw. neu auftreten, zu erkennen und zuzuordnen.

Anfangs wurden die Produkte der CoA-Synthese mit Hilfe das Programms von King et *al.* (1988, Höschle, 2006; Chattopadhyay, 2007) überprüft. Dabei wurde das Programm entsprechend den Angaben im Abschnitt 3.12.1. etwas modifiziert.

Mit dem Puffersystem 0,2 M Na-Phosphatpuffer und 0,25 M Na-Phosphatpuffer mit Acetonitril war es in diesem Falle möglich, die Proben CoenzymA, Acetyl-CoA, Methylcrotonyl-CoA und Isovaleryl-CoA gut zu trennen (Abb. 4.75). Dagegegen konnte eine gute und damit deutliche Trennung der Proben Citronellyl-CoA (CCoA) und Geranyl-CoA (GCoA) nicht erreicht werden (Tab. 4.8, Abb. 4.76). Für reines CoenzymA (CoA) konnte bei den Messungen jeweils lediglich ein Peak mit einer Retentionszeit im Bereich von 20-21,5 min festgestellt werden. Auch für die anderen als Referenz genutzten Proben, welche kommerziell erhältlich sind (Acetyl-CoA, Methylcrotonyl-CoA und Isovaleryl-CoA) konnten Chromatogramme mit nur sehr geringem Hintergrund erhalten werden. Bei Acetyl-CoA traten im Vergleich zum CoenzymA zwei Peaks im Chromatogramm in Erscheinung. Diese lagen im Bereich von 26 und 29 min. Für gekauftes Methylcrotonyl-CoA konnte ein Peak bei ca. 43 min und für Isovaleryl-CoA ein Peak bei ca. 46 min beobachtet werden. Wurden selbstsynthetisierte CoA-Ester mittels dieser Analytik untersucht, so konnten hier im Vergleich zu den gekauften Proben einige zusätzliche Peaks im Chromatogramm festgestellt werden (Abb. 4.77, Abb. 4.78). Diese Signale stellen sehr wahrscheinlich Verunreinigungen dar, und lassen sich durch die Tatsache erklären, dass die CoA-Ester nach ihrer Synthese nicht weiter aufgereinigt wurden. Nichtsdestotrotz konnten die Signale der Hauptpeaks den CoA-Estern zugeordnet werden. Von den gesamten zu untersuchenden Proben wurden 5 mM Stammlösungen hergestellt und mittels HPLC analysiert. Der Gehalt der selbsthergestellten Proben wurde dabei mit 100 % angenommen. In den Abbildungen 4.77 und 4.78 in welchen gekauftes und selbsthergestelltes Metyhlcrotonyl-CoA bzw. Isovaleryl-CoA verglichen wurden, konnte deutlich der wesentlich geringere Gehalt der entsprechenden selbst synthetisierten Proben festgestellt werden. Der Anteil dieser Ester wurde daraufhin auf ca. 20 % geschätzt.

Für selbsthergestelltes Methylcrotonyl-CoA konnte ein Hauptpeak bei 43 min, wie auch schon bei gekauftem MCoA beobachtet werden. Ein zusätzlicher Peak lag bei 21,6 min (Abb. 4.77). Da das Signal von reinem CoA bei dieser Retentionszeit auftrat, konnte somit angenommen werden, dass in der Probe auch nicht umgesetztes CoA zu finden war. Für Isovaleryl-CoA, welches selbst hergestellt wurde, konnten Signale im Bereich von 21 und 46 min erhalten werden (Abb. 4.78). Eine Unterscheidung von CCoA und GCoA war aufgrund der nahe beieinander liegenden Retentionszeiten nicht gut möglich (Abb. 4.76). Die entsprechenden Retentionszeiten lagen für Geranyl-CoA bei 25,8 für Citronellyl-CoA bei 25,9 min. Die erhaltenen Retentionszeiten sind in der Tabelle 4.8 zusammengefasst.



Abb. 4.75: HPLC-Läufe der einzelnen zur Verfügung stehenden, gekauften CoA-Ester Proben Mit Hilfe des Na-Phosphatpuffer Systems ist eine gute Trennung der einzelnen Proben möglich. Dabei liegen die Retentionszeiten für CoA (Coenzym) bei 21,4 min; für ACoA (Acetyl-CoA) bei 25,9 min; für MCoA (Metylcrotonyl-CoA) bei 43,1 min und für ICoA (Isovaleryl-CoA) bei 45,9 min.





Im Falle der Proben GCoA und CCoA ist mit Hilfe des Na-Phosphatpuffer Systems keine Trennung möglich. Die Retentionszeiten für GCoA bzw. CCoA liegen mit 25,8 min bzw. 25,9 min zu dicht beieinander, um eine mögliche Identifizierung in entsprechenden Reaktionsansätzen über diese Analyse zu ermöglich.



Abb. 4.77: Vergleichende Betrachtung der HPLC Daten für gekauftes (blau) und selbst synthetisierten (rot) Methylcrotonyl-CoA

Mit Hilfe dieser Analyse wird deutlich, dass in der selbsthergestellten Probe Verunreinigungen enthalten sind (zusätzliche Peaks) und das der Gehalt an MCoA wesentlich geringer ist.



Abb. 4.78: Vergleichende Betrachtung der HPLC Daten für gekauftes (blau) und selbst synthetisierten (rot) Isovaleryl-CoA

An Hand der Daten kann in der selbsthergestellten Probe eine Verunreinigung festgestellt werden, welche in der gekauften Probe nicht zu beobachten ist. Weiterhin muss festgehalten werden, dass der Gehalt an CoA-Ester in der selbst hergestellten Probe geringer ausfällt.

	Na-Phosphat Puffersystem ¹	Ammoniumformiat/Methanol und Acetonitril ²	Ammoniumacetat und Acetonitril/Methanol ³		
CoenzymA (CoA)	21,4	16,3; 23,0; 24,1;24,5 und 25,0	7,4 und 7,9		
Acetyl-CoA (ACoA _{Sigma})	25,9 und 29,3	24,0; 24,3; 24,5; 24,6 und 25,3	nb		
Methylcrotonyl- CoA (MCoA _{Sigma})	43,0	9,1; 24,2; 24,6; 24,8 und 25,5 bis 25,6	nb		
Methylcrotonyl- CoA (MCoA _{Synt})	43,0 und 21,6	23,1; 24,2; 25,4 und 25,8	8,4; 10,7 und 12,6		
Citronellyl-CoA (CCoA)	25,9	10,8; 23,6 bis 23,9; 24,5; 25,0; 25,4 und 25,9 bis 26,8	8,2; 10,5 und 19,8		
Geranyl-CoA (GCoA)	25,8	23,8; 24,1; 24,6; 25,3 und 26,0	7,6; 8,2; 8,6; 10,5; 18,8; 19,0 und 19,5		
Isovaleryl-CoA (ICoA)	46,1 und 25,9	nb	nb		
Isovaleryl-CoA (ICoA _{Sigma})	45,9	24,0; 24,7; 25,0 und 25,5 bis 25,7	nb		

Tab. 4.8:	Gegenüberstellung der	Ergebnisse zur	· Trennung	verschiedener	CoA-Ester	mit	Hilfe	von
	unterschiedlichen Puffersystemen							

Legende: nb: nicht bestimmt; ¹: Chattopadhyay, 2007; King et *al.*, 1988; ²: Förster-Fromme *et al.*, 2006; ³: Holtzapple & Schmidt-Dannert, 2007

Weiterhin wurden verschiedene Lösungsmittel für die CoA-Ester getestet, um eine mögliche Verbesserung des Laufverhaltens und der Auftrennung in der HPLC zu ermöglichen. Hierfür kamen neben destilliertem Wasser nun auch Methanol, Aceton und Acetonitril zum Einsatz. Da jedoch nicht alle Proben in den Lösungsmitteln Methanol, Aceton bzw. Acetonitril lösbar waren, und mit den entsprechenden Messungen der Überstände keine Ergebnisse erzielt werden konnten (Daten nicht gezeigt), wurde zum Zwecke der Vergleichbarkeit der Proben und ihrer Chromatogramme entschieden, diese im Verlauf der vorliegenden Arbeit in dest. Wasser gelöst in der HPLC Analytik zu verwenden.

Ebenso wurde im Rahmen dieser Analytik auch ein weiteres Puffersystem und dessen Wirkung untersucht. Da neben der HPLC Analytik auch eine Untersuchung der Proben mittels HPLC-(ESI)-MS erfolgte, sollten in diesem Zusammenhang damit außerdem vergleichbare Laufbedingungen gefunden werden, um einen besseren Vergleich beider Analysemethoden zu ermöglichen. Die Analytik von Proben mittels HPLC-(ESI)-MS in Hohenheim erfolgte mit dem Puffersystem Ammoniumformiat/Methanol und Acetonitril. Um die erhaltenen Chromatogramme auch mit denen am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart erhaltenen vergleichen zu können, sollte dieses Puffersystem auch unter den vorliegenden Bedingungen getestet werden (Kap.3.12.1.). Leider konnte jedoch nicht für alle Proben eine geeignete Auftrennung erreicht werden. Kleinere zusätzliche Peaks traten in den Chromatogrammen in Erscheinung, bzw. kam es zum "Verschmieren" von Peaks über einen größeren Zeitbereich wie z.B. bei Citronellyl-CoA, Isovaleryl-CoA und Methylcrotonyl-CoA (siehe einzelne Retentionszeiten in Tabelle 4.8). Dieses Puffersystem war somit nicht für eine Untersuchung geeignet, bei der unterschiedliche CoA-Ester nachgewiesen werden sollten.

Um eine bessere Trennung von Citronellyl-CoA und Geranyl-CoA zu ermöglichen, wurde somit auf das Phosphatpuffersystem zurückgegriffen, mit welchem bei den übrigen Proben bereits gute Ergebnisse erzielt werden konnten. Im Folgenden sollte daher nun versucht werden, über die Veränderung der Laufbedingungen eine bessere Trennung zu erreichen. Hierfür wurde zunächst der angelegte Gradient im HPLC-Programm variiert. Während dieser bei den ersten Untersuchungen bei 40 min lag, wurde folgend die Änderung der Pufferkonzentrationen über einen steileren (ca. 20 min) bzw. über einen flacheren Gradienten (60 bzw. 120 min) eingestellt. Die Ergebnisse dieser Versuche wurden in der Tabelle 4.9 festgehalten. Wie dort ersichtlich ist, war eine bessere Trennung der beiden Proben Citronellyl-CoA und Geranyl-CoA durch Veränderung dieses Parameters nicht möglich. Es konnte lediglich eine Verschiebung der einzelnen Retentionszeiten beobachtet werden. Bei einem angelegten Gradienten über 20 min war es möglich GCoA und CCoA bereits nach 17,7 min zu detektieren. Zum Vergleich dazu nahmen die Retentionszeiten der beiden Proben mit einem flacher angelegten Gradienten weiter zu. So lagen diese bei einem angelegten Gradienten über 40 min bei 25,8 (GCoA) bzw. 25,9 min (CCoA) und bei einem Gradienten über 60 min bei 36,8 (GCoA) und 36,9 min (CCoA). Auch durch eine Veränderung der Flussraten oder eines Laufes unter isocratischen Bedingungen, konnte das gewünschte Ziel eine deutlichere Trennung von GCoA und CCoA zu erhalten, nicht erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

 Tab. 4.9:
 Versuch der Trennung der Verbindungen Geranyl-CoA und Citronellyl-CoA über Veränderung des angelegten Gradienten

 Aufgeführt sind jeweils die Retentionszeiten der Hauptpeaks der einzelnen HPLC-Läufe. Verwendet wurde das Phosphatpuffersystem und das Programm CoAEster.M welches entsprechen variiert wurde.

 Gradient
 Geranyl-CoA
 Citronellyl-CoA

 (Retentionszeit des Hauptpeaks)
 (Retentionszeit des Hauptpeaks)

	(Retentionszeit des Hauptpeaks)	(Retentionszeit des Hauptpeaks)
über 20 min	17,71 min	17,75 min
über 40 min	25,89 min	25, 94 min
über 60 min	36,85 min	36,94 min
über 120 min	60,23 min	60,34 min

Durch die hier getesteten Parameter konnten Citronellyl-CoA und Geranyl-CoA mittels HPLC nicht getrennt werden. Der Unterschied in lediglich einer Doppelbindung in der Struktur, war somit anscheinend nicht ausreichend, für einen signifikanten Unterschied im Laufverhalten dieser beider Substanzen. Dadurch wurde eine Unterscheidung der beiden Verbindungen in möglichen Reaktionsansätzen schwierig. Ferner war es aufgrund dieser Tatsache auf diesem Wege nicht möglich, *cis*-Geranyl-CoA, welches aus der Reaktion der Citronellyl-CoA Dehydrogenase aus Citronellyl-CoA gebildet wird, zu isolieren.

4.7.2. Verfolgen von Enzymreaktionen über HPLC und HPLC-(ESI)-MS Analyse

Das Verfolgen von Carboxylase-Reaktionen über eine zu beobachtende Absorptionsänderung im Photometer war nicht in allen Fällen erfolgreich. In der Annahme, dass dies vielleicht durch zu geringe Umsätzen des Enzyms bedingt war, wurden des weiteren Versuche unternommen diese Enzymumsätze mittels HPLC-Analyse zu untersuchen. Diese Untersuchungen wurden zunächst mit dem Phosphatpuffersystem durchgeführt. Um jedoch gleiche Bedingungen zu den ebenfalls durchgeführten HPLC-(ESI)-MS Messungen (Kap.3.13.) zu gewährleisten, wurden später auch Untersuchungen mit dem Puffersystem Ammoniumacetat und Acetonitril/Methanol (Holtzapple & Schmidt-Dannert, 2007) durchgeführt (Kap.3.12.1.) und in diesem Abschnitt besprochen.

Für die Analyse der Enzymreaktionen mittels HPLC wurden die entsprechenden Reaktionen wie im Abschnitt 3.14. beschrieben angesetzt. Die Ansätze wurden für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, Proben jeweils nach 1, 5, 15 und 30 min in die entsprechenden HPLC-Vials überführt und mittels HPLC analysiert.

4.7.2.1. Reaktionen mit Citronellyl-CoA (Citronellyl-CoA Dehydrogenase)

Um die Umsetzung von Citronellyl-CoA (CCoA) zu untersuchen, wurden neben Rohextrakt von *P. aeruginosa* PAO1 Cs Zellen auch *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*atuD* sowie als Kontrolle *E. coli* JM109 pJoe4036.1 in die entsprechenden Reaktionen eingesetzt.

Bei der Messung der Hintergrundreaktion, welche im Ansatz CCoA aber nicht die Citronellyl-CoA Dehydrogenase enthielt, konnten die charakteristischen Peaks des Citronellyl-CoAs identifiziert werden (Tab. 4.8). Nach Zugabe von Rohextrakt von *E. coli* JM109 pJoe4036.1::*atuD* konnte nun im Bereich von 20 min der Peak festgestellt werden, dessen Fläche im Vergleich zum 20 min Peak der Hintergrundreaktion (CCoA) stark reduziert war. Die auch in der Hintergrundreaktion auftretenden Peaks bei 8,3 und 10,7 min zeigten dagegen eine deutliche Zunahme. Ein neuer Peak trat lediglich bei 7,7 min in Erscheinung (Abb. 4.79). Das Ergebnis änderte sich mit zunehmender Inkubationszeit nur minimal. Bei dem Lauf eines wiederholten Ansatzes konnten dazu zum Vergleich nach einer Minute Inkubationszeit ein im Bereich von 20 min liegender zweier Peak bzw. nach 30 min ein dreier Peak festgestellt werden, deren Flächen im Vergleich zum 20 min Peak der Hintergrundreaktion deutlich reduziert waren (Daten nicht gezeigt).





Zu erkennen ist eine Abnahme des Peaks bei 19,9 min und ein neu auftretender Peak bei 7,6 min.

Wurde die Reaktion mit zusätzlich PMS im Ansatz durchgeführt, so wurde in der Hintergrundreaktion ein zusätzlicher Peak (26,1 min) vergleichend zur Reaktion ohne PMS festgestellt (Abb. 4.80). Nach Inkubation des Ansatzes mit *E. coli* Rohextrakt traten bei dieser

Reaktion an Stelle des 19,9 min Peaks (CCoA, Fläche 780 mAU*s) zwei Peaks mit einer ähnlichen Größe auf (19,2 min 770 mAU*s und 19,5 min 714 mAU*s). Vergleicht man die Retentionszeiten der einzelnen CoA-Ester (Tab. 4.8) so könnte es sich hier um neu entstandene GCoA Peaks handeln. Dagegen sprechen würde jedoch die vergleichbare Peakfläche beider Peaks zum Ausgangspeak in der Reaktion ohne Enzym. Ein neuer Peak bei 7,6 min trat bei diesem Reaktionsansatz nicht auf. Auch nach einer Inkubation von 30 min zeigte sich keine Veränderung. Die Peaks im Bereich von 19 min zeigten lediglich eine geringfügige Änderung auf 681 und 706 mAU*s.



Abb. 4.80: Darstellung der Enzymreaktion von CCoA mit AtuD (Rohextrakt von *E. coli* pJoe4036.1::*atuD*) mit zusätzlich PMS als Elektronenakzeptor im Ansatz (vgl. Enzym-Assay)

In [blau] die Messung des Ansatzes ohne Enzym und in [rot] die entsprechende Messung des Ansatzes nach Zugabe von Rohextrakt von *E. coli* pJoe4036.1::*atuD* nach 1 min Inkubationszeit. Zu erkennen ist ein zusätzlicher neuer Peak bei 26 min, welche sehr wahrscheinlich dem PMS entspricht. Weiterhin resultieren durch die Zugabe von Rohextrakt zwei Peaks im Bereich von 19,2 bzw. 19,5 min. Vor Zugabe von Enzym lag der Ausgangspeak bei 19,9 min (CCoA).

Wurde folgend Wildtyp-Rohextrakt (*P. aeruginosa* PAO1 Cs Zellen) eingesetzt, so konnte im Vergleich zur Hintergrundreaktion eine starke Abnahme der Peakfläche des Peaks bei ca. 20 min beobachtet werden (Abb. 4.81). Diese lag ohne Inkubation mit Rohextrakt bei 587 mAU*s und reduzierte sich nach Zugabe von Rohextrakt auf 203 (1 min) bzw. auf 114 mAU*s (30 min). Auch bei diesem Ansatz konnte ein neuer Peak bei 7,7 min beobachtet werden, dessen Fläche jedoch mit zunehmender Inkubation nicht weiter zunahm.



Abb. 4.81: Darstellung der Enzymreaktion von *P. aeruginosa* PAO1 Cs Zellen mit CCoA als Substrat In [blau] die Messung des Ansatzes ohne Enzym und in [rot] die entsprechende Messung des Ansatzes nach Zugabe von Rohextrakt und 1 min Inkubationszeit. Zu erkennen ist eine deutliche Abnahme des Peaks im Bereich von 20 min. Weiterhin tritt ein neuer Peak bei 7,7 min in Erscheinung.

Erfolgte zum gleichen Reaktionsansatz wiederum die Zugabe von zusätzlich PMS, so konnte der entsprechende Peak bei 26,2 min festgestellt werden. An der Stelle des Peaks, welcher dem Citronellyl-CoA entsprach (19,9 min), zeigte sich nach Zugabe von *Pseudomonas* Rohextrakt ein dreier Peak (19,2 min 122 mAU*s, 19,5 min 68 mAU*s und 20 min 13 mAU*s) (Abb. 4.82). Ein deutlicher Peak mit einer Retentionszeit von 7,7 min konnte hier nicht festgestellt werden. Ein entsprechender Peak lag im Bereich des Hintergrundes und zeigte lediglich eine Fläche von 17 mAU*s. Im Vergleich dazu wies der Peak in der Reaktion ohne PMS eine Fläche von 346 mAU*s auf. In dieser Reaktion trat dagegen ein neuer Peak mit einer Retentionszeit von 16 min im Chromatogramm auf. Weiterhin konnte bei beiden Reaktionen mit Wildtyp-Rohextrakt eine deutliche Zunahme des Peaks bei 8,2 min, wie schon in den vorangegangenen Reaktionen festgestellt werden.



Abb. 4.82: Darstellung der Enzymreaktion von *P. aeruginosa* PAO1 Cs Zellen mit CCoA als Substrat mit zusätzlich PMS im Ansatz (vgl. zur Enzymassay) In [blau] die Messung des Ansatzes ohne Enzym und in [rot] die entsprechende Messung des Ansatzes nach Zugabe von Rohextrakt und 1 min Inkubationszeit. Zu erkennen ist eine deutliche Abnahme des Peaks im Bereich von 20 min, wobei die Zugabe von Wildtyp-Rohextrakt auch hier wieder einen Doppelpeak im Bereich von 19,5 min bedingt. Weiterhin tritt ein neuer Peak bei einer Retentionszeit von 16 min auf.

Als mögliche Kontrolle wurden weiter auch Reaktionen mit Rohextrakt von *E. coli*, welcher lediglich den leeren Vektor pJoe4036.1 enthielt durchgeführt. Ohne AtuD wurde keine Umsetzung von CCoA erwartet, allerdings zeigten sich auch hier die starke Abnahme des Peaks im Bereich von 20 min und der neu auftretende Peak bei 7,7 min (Daten nicht gezeigt). Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass im *E. coli* Rohextrakt gegebenenfalls eine unspezifische Dehydrogenase eine Umsetzung vom CCoA bewirkte, wurde der Rohextrakt folgend durch Abkochen inaktiviert und in die entsprechende Reaktion eingesetzt. In diesem Falle konnte nun keine Reaktion beobachtet werden. Es wurde weder eine Abnahme des charakteristischen CCoA Peaks (20 min) noch ein deutlich neu auftretender Peak beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, das sowohl bei Einsatz von Wildtypenzym aus *P. aeruginosa* PAO1 (Rohextrakt Cs Zellen) als auch rekombinantem AtuD (*E. coli* Rohextrakt) der CCoA Peak bei ca. 20 min schon nach 1 min Inkubationszeit stark abgenommen hatte. Des Weiteren konnte ein neuer Peak bei 7,7 min beobachtet werden. Wurde das Experiment mit Rohextrakt von *E. coli* JM109 pJoe4036.1 durchgeführt, so wurde das gleiche Ergebnis erhalten, wodurch die Vermutung nahe liegt, das im Rohextrakt auch andere in diesem enthaltene Dehydrogenasen eine Rolle spielen könnten.

Bei der Untersuchung der Proben über HPLC-(ESI)-MS Messungen, konnte im Reaktionsansatz mit *E. coli* Rohextrakt mit pJoe4036.1::*atuD* lediglich die Masse des GCoA-Esters identifiziert werden (m/z = 916). Die Masse von CCoA (m/z = 918), welche in der Hintergrundreaktion ohne Enzym identifiziert werden konnte, war an dieser Stelle im Ansatz nicht mehr nachzuweisen (Daten nicht gezeigt). Somit kann davon ausgegangen werden, dass der Umsatz von Citronellyl-CoA zu Geranyl-CoA erfolgreich war. Bei der Reaktion mit Rohextrakt von *P. aeruginosa* PAO1 war keine Aussage möglich, da die Substanzen eine zu geringe Konzentration aufwiesen. Der neu aufgetretenen Peaks bei 7,7 min bzw. 16 min konnte bei diesen Untersuchungen (in Hohenheim) nicht identifiziert werden, sodass unklar ist, welche Verbindungen sich hinter diesen verbergen könnten.

4.7.2.2. Reaktionen mit Geranyl-CoA (Geranyl-CoA Carboxylase)

Für die Untersuchung der GCase Reaktion standen Rohextrakt von *P. aeruginosa* PAO1 (Glu und Cs Zellen) und aus diesem über monomeres Avidin aufgereinigte und aufkonzentrierte Proteinlösung zur Verfügung. Um zu überprüfen, ob die koppelnden Enzyme des Carboxylase Assays Pyruvatkinase und Lactatdehydrogenase einen Einfluss auf die Laufbedingungen der Reaktionsansätze besaßen, wurden Reaktionen mit und ohne Zugabe dieser Enzyme überprüft (Daten nicht gezeigt). Da jedoch bei diesen Läufen keine Unterschiede festgestellt werden konnten, wurden im folgenden Verlauf die vollständigen Reaktionsansätze untersucht.

In der Hintergrundreaktion, welche im Ansatz GCoA aber kein Carboxylase Enzym enthielt, konnten charakteristische Peaks für das Geranyl-CoA identifiziert werden (Tab. 4.8; Abb. 4.83). Diese zu beobachtende Dreier-Peak-Konstellation zeigte Retentionszeiten im Bereich von 19 min (18,9; 19,1 und 19,5 min). In der Reaktion 1 min nach Zugabe von Rohextrakt von *P. aeruginosa* (Cs Zellen), konnte eine deutliche Abnahme (137-168 mAU*s auf 17-61 mAU*s) dieser Peaks und gleichzeitig das Erscheinen eines neuen Peaks bei 15,9 min festgestellt werden (Abb. 4.83). Die Reaktion nach 30 min zeigte nur noch geringfügige Veränderungen in den Peakflächen.



Abb. 4.83:Darstellung der Enzymumsetzung von GCoA durch Einsatz von P. aeruginosa Rohextrakt
(Cs Zellen) als Quelle des eingesetzten Enzyms
In [blau] die Messung des Ansatzes ohne Enzym und in [rot] die entsprechende Messung des
Ansatzes nach Zugabe von Rohextrakt von P. aeruginosa nach 1 min Inkubationszeit. Zu
erkennen ist eine Abnahme des GCoA Peaks im Bereich von 19 min und ein neu auftretender
Peak bei 16 min.

Bei Zugabe von abgekochtem Rohextrakt zum Reaktionsansatz konnte im Vergleich dazu keine Reaktion festgestellt werden. Die Peaks im Bereich von 19 min zeigten keine Veränderung in der Peakfläche (Daten nicht gezeigt). Untersuchungen erfolgten auch mit Rohextrakt von Zellen, welche lediglich mit Glukose angezogen wurden. Da bei diesen Zellen weder der Atu- noch der Liu-Weg induziert werden, wurde hier keine Reaktion und somit kein Umsatz von GCoA erwartet. Es zeigte sich jedoch, dass es auch in diesen Ansätzen zu eine Abnahme der Peaks im Bereich von 19 min kam (100-124 mAU*s auf 22 mAU*s) (Abb. 4.84). Ferner trat auch hier ein neuer wenn auch wesentlich kleinerer Peak bei 16 min in Erscheinung (58 mAU*s anstatt 161 mAU*s bei Verwendung von Cs Zellen Rohextrakt). Bei einer parallel durchgeführten Reaktion konnte dagegen eine Abnahme der Peaks im 19 min Bereich festgestellt werden, nicht aber ein neuer Peak im Bereich von 16 min. Weiterhin konnten bei der Analyse des Substrates GCoA in einigen Läufen auch Peaks in diesem Bereich gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Aber selbst wenn es sich bei diesem 16 min Peaks um ein Artefakt des GCoA Substrates handeln sollte, so kann die Abnahme der 19 min Peaks durch Rohextrakt von Glu Zellen nicht erklärt werden.





Ansatzes nach Zugabe von Rohextrakt von *P. aeruginosa* nach 1 min Inkubationszeit. Zu erkennen ist ein Verschwinden der GCoA Peaks im Bereich von 19 min und ein neu auftretender Peak bei 16 min.

Wurde aus *Pseudomonas* Rohextrakt (Cs Zellen) aufgereinigte und aufkonzentrierte Proteinlösung hinsichtlich der Carboxylase Umsetzung untersucht, so konnte bei Einsatz dieser Enzymquelle keine Veränderung in den entsprechenden Chomatogrammen festgestellt werden (Abb. 4.85). Eine Abnahme der 19 min Peaks und damit eine Reaktion der Carboxylase war bei diesen Reaktionen nicht zu beobachten. Entsprechend waren auch die Ergebnisse, bei welchen die eingesetzten Enzym-Lösungen zuvor abgekocht wurden. Auch bei Verwendung dieser Proben konnten keine Veränderungen in den Chromatogrammen festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).



Abb. 4.85:Darstellung der Enzymreaktion mit GCoA unter Verwendung von aus P. aeruginosa
Rohextrakt (Cs Zellen) aufgereinigter und aufkonzentrierter Proteinlösung
In [blau] die Messung des Ansatzes ohne Enzym und in [rot] die entsprechende Messung des
Ansatzes nach Zugabe von Protein nach 1 min Inkubationszeit. Mit aufgereinigtem Enzym
konnte an dieser Stelle keine Reaktion festgestellt werden.

In der Untersuchung der Proben über HPLC-(ESI)-MS konnte im Ansatz ohne Enzym GCoA (m/z = 916) festgestellt werden. Bei der Untersuchung der Proben nach Zugabe von Enzymlösung konnte bei beiden Reaktionen keine Aussage gemacht werden, da es nicht möglich war CoA-Ester in diesen Proben zu identifizieren. Bei einem erneuten Versuch des Ansatzes mit Rohextrakt von *P. aeruginosa* PAO1 (Cs Zellen) konnte GCoA als Substrat in der Reaktion identifiziert werden. Dagegen war es sowohl in dieser, als auch in den anderen Reaktionsansätzen, nicht möglich die Masse von Isohexenyl-glutaconyl-CoA, dem carboxyliertem Produkt der Reaktion, festzustellen, sodass eine Reaktion an dieser Stelle nicht nachweisbar war.

4.7.2.3. Reaktionen mit Methylcrotonyl-CoA (Methylcrotonyl-CoA Carboxylase)

Um die Umsetzung von Methylcrotonyl-CoA zu untersuchen, wurde Rohextrakt von *P. aeruginosa* PAO1 (Iso Zellen) und aus diesem aufgereinigte und aufkonzentrierte Enzymlösung verwendet. In der getesteten Hintergrundreaktion, welche zwar das Substrat aber keine Enzymlösung enthielt, konnte der charakteristische Peak des MCoAs bei einer Retentionszeit von 12,7 min identifiziert werden. Nach einer Zugabe von *P. aeruginosa* Rohextrakt, welcher aus mit Isovaleriansäure gewachsenen Zellen gewonnen wurde, konnte eine Abnahme der Peakfläche des Peaks bei 12,7 min festgestellt werden (von 484 auf 225 mAU*s). Ein signifikanter, neuer Peak dagegen trat in dieser Reaktion nicht auf. Lediglich eine Zunahme eines Peaks bei 4,9 min von 158 auf 722 mAU*s war festzustellen (Abb. 4.86).



Abb. 4.86: Darstellung der Enzymreaktion von Rohextrakt von *P. aeruginosa* (Iso Zellen) als Enzymquelle mit MCoA als Substrat

In [blau] die Messung des Ansatzes ohne Enzym und in [rot] die entsprechende Messung des Ansatzes nach Zugabe von Rohextrakt von *P. aeruginosa* nach 1 min Inkubationszeit. Zu erkennen ist eine deutliche Abnahme des MCoA Peaks bei 12,7 min.

Bei den entsprechenden Reaktionen mit abgekochtem Rohextrakt konnten keine Veränderungen im Chromatogramm im Vergleich zur Hintergrundreaktion und damit keine Reaktion festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Bei Einsatz von aus Rohextrakt über Avidin-Gel partiell aufgereinigter Enzymlösung (Iso Zellen) als Carboxylasequelle zeigte sich dagegen eine Abnahme des MCoA Peaks bei 12,7 min (Abb. 4.87). Ein neuer Peak konnte in diesem Chromatogramm allerdings nicht festgestellt werden. In weiteren Reaktionen wurde nun auch Rohextrakt von mit Glukose angezogenen Zellen von *P. aeruginosa* (Glu Zellen) als Kontrolle getestet. Nach Zugabe zum Ansatz konnte aber auch hier wider erwarten eine Abnahme des MCoA Signals beobachtet werden. Des Weiteren wurde die Zunahme des 4,8 min Peaks festgestellt (Daten nicht gezeigt).



Abb. 4.87:Darstellung der Enzymreaktion von aus Rohextrakt von P. aeruginosa (Iso Zellen)
aufgereinigter und aufkonzentrierter Proteinlösung mit MCoA als Substrat
In [blau] die Messung des Ansatzes ohne Enzym und in [rot] die entsprechende Messung des
Ansatzes nach Zugabe von aufgereinigtem P. aeruginosa Protein nach 1 min Inkubationszeit. Zu
erkennen ist eine Abnahme des MCoA Peaks bei 12,7 min.

In der Probe mit MCoA, welche jedoch noch keine Enzymlösung enthielt, konnte das eingesetzte Substrat über HPLC-(ESI)-MS Analyse über die Masse identifiziert werden (m/z = 848). Bei Zugabe von Rohextrakt von *P. aeruginosa* PAO1 wurde nur wenig MCoA gefunden. Die Masse von 3-Methyl-glutaconyl-CoA war im Ansatz noch geringer und lag an der Nachweisgrenze (persönliche Mitteilung Dr. Armbruster). Wurde der Reaktionsansatz mit aufgereinigter MCase aus *P. aeruginosa* untersucht, so war keine eindeutige Aussage möglich, da das Signal zum einen sehr gering war und zum anderen im Hintergrundrauschen unterging. Daher konnte nicht ausgeschlossen werden, dass das carboxylierte Produkt der Reaktion in dieser Probe enthalten war (persönliche Mitteilung Dr. Armbruster).

Bei Reaktionen, die zunächst durch eine Abnahme des entsprechenden Substratpeaks positiv erschienen, konnten folgend nach Messung der Kontrollreaktionen nicht mehr eindeutig zugeordnet werden. Zwar erfolgte keine Abnahme der Substrate bei Einsatz von abgekochten und damit inaktiven Enzymlösungen, jedoch konnte eine solche Abnahme bei Zugabe von Glukose-Rohextrakten von *P. aeruginosa* bzw. *E. coli* Rohextrakten ohne rekombinantes Protein beobachtet werden. Aufgrund dieser Beobachtung, dass somit auch Rohextrakte allein ohne die entsprechenden Enzyme einen Einfluss auf die zugegebenen Substrate zu haben scheinen, war an dieser Stelle über die Analyse mittels HPLC keine Aussage über die Enzymumsetzungen möglich.

Letztendlich konnte nur die Reaktion der Citronellyl-CoA Dehydrogenase AtuD mit Citronellyl-CoA als Substrat über die Massenanalyse bestätigt werden. Eine Reaktion der Geranyl-CoA Carboxylase mit GCoA war an dieser Stelle nicht nachweisbar und die der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase mit MCoA ließ sich aufgrund der Nähe zur Nachweisgrenze lediglich vermuten.

Versuche die Läufe im Labor in Stuttgart bzw. Hohenheim vergleichbar zu gestalten, schlugen fehl. Das Puffersystem, welches in Hohenheim verwendet wurde (97 % Ammoniumformiat und 3 % Acetonitril), war zur Auftrennung der Proben in Stuttgart nicht geeignet. Aber auch die Verwendung der gleichen Säule in beiden Laboren zeigte Unterschiede in den entsprechenden Chromatogrammen, sodass diese nicht miteinander verglichen werden konnten. Mit dem eigentlich für beide Methoden geeigneten Puffersystem Ammoniumacetat und Acetonitril/Methanol (Holtzapple & Schmidt-Dannert, 2007) konnten zwar an der HPLC in der Mikrobiologie nicht aber an der HPLC-(ESI)-MS Anlage in Hohenheim gute Ergebnisse erziehlt werden. Somit war es im Verlauf der Arbeiten nicht möglich in der HPLC neu auftretenden Peaks, welche zuvor besprochen wurden, eine Masse über das HPLC-(ESI)-MS und folglich eine mögliche Verbindung zuzuordnen.

4.7.3. Nachweis der Carboxylase Reaktion über den Nachweis der Nukleotide

Die Umsetzung von Geranyl-CoA bzw. Methylcrotonyl-CoA durch die Geranyl-CoA bzw. die Methylcrotonyl-CoA Carboxylase führt zur Bildung von ADP. Dieses ADP wird in der der Reaktion angekoppelten Enzymabfolge mit Phosphoenolpyruvat über die Pyruvat Kinase zu Pyruvat und ATP umgesetzt. Durch die sich anschließende Reaktion der Lactat Dehydrogenase, welche Pyruvat mit Hilfe von NADH+H⁺ zu Lactat und NAD⁺ umsetzt, wurde versucht die Reaktion der Carboxylasen durch eine Absorptionsänderung, bedingt

durch eine Konzentrationsabnahme des NADH+H⁺, photometrisch bei 340 nm zu verfolgen. Da dies nicht in allen Fällen möglich war, und auch das Verfolgen der Substrate mittels HPLC nicht die gewünschten Ergebnisse brachte, lag die Frage nahe, ob eine mögliche Reaktion durch Verfolgen der ATP bzw. ADP Konzentrationsänderung im Ansatz möglich wäre.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Methode nach Handrick et al. (2004) etwas modifiziert und für die Analyse herangezogen (Kap.3.12.2.). Zunächst sollte untersucht werden, ob eine Trennung der einzelnen Nukleotide und damit eine Unterscheidung dieser möglich ist. Die Untersuchung wurde mittels 80 mM Kaliumphosphat Puffer mit Methanol (77:23) als Laufmittel und einer C₈-Gromsil 100 high performence HPLC Säule (5 µm, 125 x 4 mm) in Angriff genommen. Es wurde versucht ATP, ADP und AMP eindeutig sichtbar im Chromatogramm zu trennen. Dies war durch die gewählten Bedingungen möglich. Zur Identifizierung der Einzelpeaks wurden Mischungen der drei Nukleotide getestet, wobei es durch Erhöhung der Konzentration jeweils eines Nukleotides möglich war, den Einzelpeaks in der Mischung das entsprechende Nukleotid zuzuordnen. Wie in der Abbildung 4.88 deutlich zu beobachten ist, konnte der Peak im Bereich von 4,1 min auf diese Weise dem ATP zugeordnet werden. Die steigende Konzentration an ADP zeigte sowohl auf den Peak im Bereich von 2,3 min als auch auf den Peak im Bereich von 3,1 min einen Einfluss. Der Einfluss auf den Peak im Bereich von 3,1 min war dabei deutlich stärker ausgeprägt und wurde folgend dem ADP zugeordnet. Da weiterhin die Erhöhung der Konzentration an AMP im Ansatz lediglich einen Zunahme des Signals im Bereich von 2,3 min zeigte, wurde somit dieses Signal durch das AMP bedingt. Auf diese Weise war es folglich möglich die einzelnen Signale in der Mischung den eingesetzten Substraten zuzuordnen.

Wurden die Standards in Reaktionspuffer (0,1 M Tris HCl pH 8,0) gelöst und vor der Messung mit BSA, KHCO₃ und MgCl₂, als Bestandteile des Reaktionsmixes im Carboxylase Assay, gemischt und vermessen, so änderten sich die entsprechenden Retentionszeiten für das ATP. Während das AMP das Signal bei 2,3 min und das ADP das Signal bei 2,6 min bedingte, konnten für das ATP unter diesen Bedingungen zwei Peaks bei 2,8 und 3,6 min beobachtet werden (Daten nicht gezeigt).



Abb. 4.88:Darstellung der Ergebnisse zur Trennung und Identifizierung der Nukleotide
[blau]: Mischung der Nukleotide ATP, ADP und AMP (0,5mM), [rot]: Konzentrationserhöhung
jeweils eines Nukleotids auf 1,0 mM bzw. bei [grün]: auf 1,5 mM

Auch der Einfluss von KOH und HCl, mit welchen später ggf. die Enzymreaktion gestoppt werden sollte, wurde getestet. Bei Zugabe von KOH kam es im Bereich des ADP Signals zur Ausbildung eines Doppelpeaks. Des Weiteren hatte der Einsatz von unterschiedlichen
Konzentrationen an KOH auch einen deutlichen Einfluss auf die einzelnen Signalstärken der Nukleodidstandards (Daten nicht gezeigt), wodurch dieses nicht geeignet war, um spätere Enzymreaktionen zu stoppen. Bei der Verwendung von HCl war der Einfluss auf die Signalstärke nur gering. Hier kam es zu Verschiebungen der Retentionszeiten der einzelnen Signale abhängig von der eingesetzten HCl-Konzentration im Ansatz. Bei einer Konzentration von 35 mM, was einen pH im Ansatz von 3-2,5 (pH Teststreifen) bedingte, waren die Verschiebungen akzeptabel, sodass diese Konzentration an HCl später jedoch 0,35 M im Ansatz. Da aber auch in diesem Bereich eine Messung der Standards möglich war, wurde diese Konzentration im Verlauf der Arbeit beibehalten.

Da das CoA Substrat relativ teuer ist, sollte zunächst erst einmal die Analytik über eine einfachere Reaktion getestet werden. Hierfür bot sich die Hexokinase-Reaktion (Kap.3.14.4.), in welcher eine Hexose mit ATP zu Hexose-6-phosphat und ADP umgesetzt wird, an. Diese Reaktion sollte nun genutzt werden, um zu überprüfen, ob ein Umsatz von ATP zu ADP mittels HPLC untersucht werden kann. Um zu kontrollieren, ob diese Reaktion auch im Carboxylase-Reaktionspuffer (0,1 M Tris HCl pH 8,0) möglich ist, wurde die Reaktion zunächst mit der Glukose-6-phosphat Dehydrogenase, welche Glukose-6-phosphat mit NADP zu Gluconat-6-phosphat und NADPH+H⁺ umsetzt, gekoppelt. Die Reaktion konnte am Photometer bei 340 nm verfolgt werden. Das Enzym zeigte auch in diesem Puffer Aktivität (Abb. 4.89), sodass im Folgenden die HPLC Analyse möglich war.



Abb. 4.89: Darstellung der Hexokinase Reaktion (Kap. 4.14.4.) mit 0,1 M Tris HCl pH 8,0 als Reaktionspuffer

Eine Hexokinase-Aktivität konnte auch unter diesen veränderten Bedingungen im Enzymassays am Photometer durch Zunahme der Absorption verfolgt werden.

Für die Untersuchung der Reaktion mittels HPLC wurde der Ansatz zunächst ohne das Substrat, die Glukose untersucht. Hier konnte lediglich das ATP identifiziert werden (2,8 min). Nach Zugabe von Glukose kam es schon innerhalb von wenigen Sekunden zur Umsetzung, was durch die Abnahme bzw. das Verschwinden des ATP Peaks verfolgt werden konnte. Weiterhin trat ein neuer Peak bei 2,5 min auf, welcher dem ADP zugeordnet werden konnte (Abb. 4.90).



Abb. 3.90: Darstellung der Hexokinase-Reaktion mittels HPLC Analytik Schon nach 5 s ist das ATP (2,8 min) verbraucht und ein neuer Peak bei 2,5 min (ADP) im Chromatogramm zu beobachten. RP: Reaktionspuffer

Das Abstoppen der Reaktion mit 35 mM HCl im Ansatz brachte eine geringe Verschiebung in den Retentionszeiten und eine Verbreiterung der Peaks mit sich. Auch konnte für das ATP ein vorgelagerter kleiner Peak in der Probe des Reaktionsansatzes identifiziert werden, welcher in der Mischung der Nukleotide in Reaktionspuffer und 35 mM HCl noch nicht auftrat. Die zu beobachteten Retentionszeiten der einzelnen Versuche sind in der Tabelle 4.10 festgehalten.

Nichtsdestotrotz konnte auch hier eine Abnahme des ATP Signals und eine Zunahme des ADP Signals beobachtet werden. Die Reaktion verlief in diesem Versuch jedoch deutlich langsamer. Erst in der Probe nach 5 min konnte kein ATP mehr im Reaktionsansatz festgestellt werden, sodass die Reaktion innerhalb von 1-5 min vollständig ablief. Das ADP Signal trat bereits in der Probe der Reaktion nach 5 s in Erscheinung und nahm über die Zeit weiter zu.

	AMP	ADP	ATP
Mischung der Nukleotide in Reaktionspuffer	2,4	2,6	2,8 und 3,6
Reaktionsansatz der Hexokinase- Reaktion ohne Glukose	-	-	2,8
Reaktionsansatz der Hexokinase- Reaktion mit Glukose	-	2,5	-
Mischung der Nukleotide in Reaktionspuffer mit 35 mM HCl	2,4	3	4,1
Reaktionsansatz der Hexokinase- Reaktion ohne Glukose mit 35 mM HCl	-	-	3,5
Reaktionsansatz der Hexokinase- Reaktion mit Glukose mit 35 mM HCl	-	2,7	3,5

Tab. 4.10:Zusammenfassung der Retentionszeiten [min] der einzelnen Signale unter verschiedenen
Bedingungen bzw. in den verschiedenen Reaktionen

Da es zwischenzeitlich zu Problemen bei der Trennleistung mit der verwendeten C₈-Gromsil 100 high performence HPLC Säule (5 μ m, 125x4 mm) kam, wurde folgend auf die Lichrospher 100 RP8 endc (5 μ m 125x4 mm) zurückgegriffen. Auch mit dieser war es möglich die Standardverbindungen AMP, ADP und ATP zu trennen. Die Retentionszeiten lagen mit dieser Säule für AMP bei 3,0, für ADP bei 4,1 und für das ATP bei 6,2 min.

Bei der Untersuchung der MCase Reaktion, für welche schon eine Aktivität mittels photometrischer Messung bestimmt werden konnte, wurden Proben des Ansatzes ohne Substrat und folgend nach Substratzugabe und verschiedenen Inkubationszeiten analysiert. Bei der Analyse dieser Proben konnte zunächst eine geringfügige Abnahme des ATP Signals beobachtet werden. Auch eine geringe Zunahme des ADP Signals war zu erkennen (Abb. 4.91). Diese Veränderungen waren jedoch so gering, dass es sich dabei auch um Schwankungen bedingt durch die Messung der einzelnen Läufen handeln könnte, denn auch nach mehrmaligen Durchlauf der Proben konnten entsprechende Schwankungen beobachtet werden. Für diesen Punkt würde auch die Tatsache sprechen, dass die einzelnen Proben, welche nach Substratzugabe entnommen wurden (nach 20 s, 1, 3, 5 und 10 min), nicht kontinuierlich mit der Zeit nur abnahmen (ATP Signal) bzw. im Falle des ADPs nur zunahmen. Diese Ergebnisse mussten auch bei der Verwendung der C₈-Gromsil 100 HPLC Säule dokumentiert werden (Daten nicht gezeigt). Aufgrund dieser Beobachtung muss geschlossen werden, dass eine Analyse der Carboxylase Reaktion auch über diese HPLC Analytik nicht möglich war.



Abb. 4.91: Darstellung der Ergebnisse der MCase Reaktion mittels HPLC Analytik über die Säule: Lichrospher 100 RP8

In [A] ist dabei das gesamte Chromatogramm der Reaktion gezeigt, während in [B] der ADP Peak heraus vergrößert dargestellt ist. Der Lauf der Reaktionsmischung ohne das Substrat MCoA ist in blau und die Läufe nach Zugabe des Substrates und verschiedenen Inkubationszeiten in weiteren Farben abgebildet (20 s: rot; 1 min: grün; 3 min: lila; 5 min: hellgrün und 10min: dunkles lila).

4.7.4. Umsatzberechnung der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Reaktion

Da bei der Analyse der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Reaktion über HPLC keine eindeutigen Ergebnisse, aufgrund der geringen Konzentrationen eines möglichen Produktes der Reaktion, erhalten werden konnten, stellte sich die Frage, ob der Umsatz des Enzyms ausreichend für das Verfolgen über diese Methoden war.

Wurde die Reaktion der MCase am Photometer mit Hilfe des Enzym-Assays verfolgt, so konnte eine maximale Aktiviät von 5900 mU/mg aus der Absorptionsänderung berechnet werden. Im Gegensatz zur GCase Reaktion war diese Änderung der Absorption auch deutlich am Photometer erkennbar. Die so erhaltene maximale Aktivität wurde folgend zur Berechnung des Umsatzes der Reaktion über das Lambert-Beersche Gesetz verwendet.

$\mathbf{E} = \mathbf{c} \times \mathbf{d} \times \mathbf{\varepsilon}$

E = Extinktion

- c = Konzentration der absorbierenden Substanz in der Flüssigkeit [mM]
- d = Schichtdicke des durchstrahlten Körpers [cm]
- ε = Extinktionskoeffizient [l/cm × mM]

Wird die Carboxylase Reaktion und die mit dieser im Assay gekoppelten Reaktionen betrachtet, so kann pro MCoA Verbrauch der Umsatz von einem NADH+H⁺ festgestellt werden. In der Reaktion selbst, mit welcher die oben genannte Aktivität erhalten werden konnte, wurden 20 µl einer 50 mM MCoA-Stammlösung als Substrat eingesetzt. In der Annahme, dass das synthetisierte Substrat eine Reinheit von 100 % besitzt, lag die Konzentration im Ansatz somit bei 1 mM. Die zu beobachtende Extinktionsänderung konnte im Bereich von 3,6 min mit 0,0378 ermittelt werden. Die Schichtdicke der Küvette betrug 1 cm und der für die Berechnungen herangezogene molare Extinktionskoeffizient für NADH+H⁺ 6,22 cm⁻¹ mM⁻¹ (Horecker. & Kornberg, 1948; Trentham, 1968). Mit Hilfe der Gleichung konnte mit diesen Daten eine Konzentrationsänderung von 0,006 mM berechnet werden. In der Annahme einer 100 %igen Reinheit des Substrates resultierte ein Umsatz von 0,6 % für diese Reaktion. Da angenommen werden muss, dass die Reinheit der synthetisierten Substrate deutlich geringer ausfällt, muss an dieser Stelle auch mit einem geringeren Umsatz gerechnet werden. Nichtsdestotrotz ein Umsatz und damit eine Konzentrationsänderung des Substrates in diesem Größenbereich ist sehr gering und sehr wahrscheinlich nicht als eine Änderung im Chromatogamm der entsprechenden HPLC Läufe zu verfolgen. Es ist eher wahrscheinlich, dass diese geringe Änderung in den generellen Schwankungen, denen die einzelnen HPLC Läufe unterliegen, verloren geht. Die möglichen Umsätze einer GCase Reaktion, welche schon im Photometer nicht zu verfolgen war, ist daher auch sicherlich unter diesen Bedingungen mittels HPLC nicht festzustellen.

4.8. Darstellung wichtiger Intermediaten zur Betrachtung des "lower atu pathways"

Isohexenyl-glutaconyl-CoA 20, das Produkt der Geranyl-CoA Carboxylase Reaktion im Atu-Weg, wird durch die putative Hydratase AtuE (Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase) zum 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA 21 umgesetzt. Diese Verbindung wiederum wird im Stoffwechsel von P. aeruginosa zu 7-Metyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA 23 und Acetat 22 gespalten (Schema 4.1). Im Vergleich zur Methylcrotonyl-CoA Carboxylase des Liu-Weges zeigte die Geranyl-CoA Carboxylase, sowohl aufgereinigt aus P. aeruginosa, als auch als rekombinantes Enzym aus E. coli keine Aktivität. Aufgrund der lediglich geringen Aktivitäten in Wildtyp-Rohextrakten bzw. der fehlenden Aktivitäten von aufgereinigtem Geranyl-CoA Carboxylase Enzym war es nicht möglich die Reaktionsfolge von der Geranyl-CoA Carboxylase abwärts über die Hydratase bis zur Lyase darzustellen. Somit konnten auch die benötigten Substrate der Hydratase und der Lyase auf diesem Weg nicht bereitgestellt werden. Um eine Hydratasereaktion des AtuE Proteins, aber auch die Spaltung des 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA Substrates 21 durch das Protein AtuA als mögliche 3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase untersuchen zu können, und so die von der Arbeitsgruppe postulierten Funktionen zu bestätigen, war es erforderlich die Verbindungen 20 und 21 auf andere Weise bereitzustellen.



Schema 4.1: Reaktionen der Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase (AtuE?) und der 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase (AtuA?) im "lower atu pathway" von P. aeruginosa

Die Synthese von CoenzymA-Estern wurde in der vorliegenden Arbeit durch die durch Guan et *al.* (1999; Förster-Fromme et *al.*, 2006) beschriebene Methode über das gemischte Anhydrid durchgeführt, wobei die entsprechenden Säuren in ein Anhydrid überführt und mit einer CoA-Lösung weiter umgesetzt wurden (Kap.3.11.).

Bei näherer Betrachtung der chemischen Struktur der benötigten Ausgangsverbindung **33a** für die Synthese des 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoAs **21** wird deutlich, dass zwei Enantiomere des resultierenden CoA-Esters möglich sind (**21a** und **21b**, Schema 4.2.).



Schema 4.2: Schematische Darstellung der zwei Enantiomere, des 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoAs 21, welche nach der CoA-Ester Synthese mit 33a als Edukt resultieren

Enzyme wirken in der Regel sehr spezifisch. Dabei bezieht sich dies auf den Typ der katalysierten Reaktion (Wirkungsspezifität) aber auch auf die Verbindungen, welche von den Enzymen umgesetzt werden (Substratspezifität) (Koolman & Röhm, 1994). Die Spezifität der Enzyme resultiert dabei aus ihrer räumlichen Struktur und somit aus der Anordnung der einzelnen Aminosäuren, aus denen sie aufgebaut sind.

Viele Enzyme setzen nur ein bestimmtes Enantiomer einer racemischen Mischung um. Schon Pasteur (1822-1885), welcher grundlegende Untersuchungen sowohl auf dem Gebiet der optischen Aktivität, als auch zur Haltbarkeit von Lebensmitteln ("Pasteurisieren") durchführte, beobachtete, dass die Enzyme des Schimmelpilzes *Penicillium glaucum* die natürliche (+)-Weinsäure abbauten, jedoch die unnatürliche (-)-Weinsäure unverändert ließen (Buddrus, 2003).

In Hinblick auf weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Enzymaktivitäten ergab sich daraus ein neuer und interessanter Aspekt. Im von Seubert et *al.* (1964b) postuliertem Abbauweg wird durch das Enzym Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase (AtuE) ein chirales Zentrum aufgebaut (Schema 4.1: *). Hieraus ergibt sich die Frage, ob die Einführung der Hydroxyfunktion in die Struktur durch das Enzym stereospezifisch erfolgt. Des Weiteren stehen dem nachfolgendem Enzym der Reaktionsfolge, in diesem Falle die 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase die zwei oben beschriebenen Enantiomere (**21a**, **21b**) als Substrate zur Verfügung (Schema 4.2). Eine mögliche Enantiodifferenzierung durch dieses Enzym muss somit geklärt werden. Für die weitere biologische Untersuchung der beiden Enzyme AtuE und AtuA wurde es daher erforderlich, sowohl die Vorstufe für das Hydratase-Substrat **125** doppelbindungsisomerenrein, als auch die daraus resultierenden hydroxylierten Isoformen **126a** und **126b** als Vorstufe des Lyase-Substrates **21** enantiomerenrein zugänglich zu machen. In dann sich anschließenden Untersuchungen sollten die Aktivitäten der

Hydratase bzw. der Lyase mit diesen Substraten überprüft werden. Dabei stellt auf biologischer Ebene die Frage, ob das Protein AtuA die Reaktion der Lyase katalysieren kann, oder ob diese Funktion, wie von der Arbeitsgruppe Campos-García (Aguilar et *al.*, 2006; Chavez-Aviles et *al.*, 2009; Chavez-Aviles et *al.*, 2010) angenommen, durch die Lyase des Liu-Weges LiuE übernommen wird, eine zentrale Rolle. Weiterhin bleibt an dieser Stelle zu klären, ob beide Enantiomere durch das Protein umgesetzt werden können. Ist dies nicht möglich, so muss geklärt werden, welche der beiden Formen verwertet wird.

Um die beiden Enantiomere **21a** und **21b** in reiner Form zu erhalten, sollten Oxazoline, welche enantiomerenrein aus Aminosäuren zugänglich sind, als Schutzgruppe für die Säurefunktion des benötigten Substrates verwendet werden (Schema 4.3.). Hierdurch resultieren aus den Enantiomeren, Diastereomere, welche sich mittels Chromatographie trennen lassen. Des Weiteren stellen Oxazoline im Bezug auf Carbonsäureester orthogonal geschützte Carbonsäurederivate dar. Bei Einsatz eines Alkylesters und eines Oxazolins als Seitenkette ist somit eine selektive Spaltung des Oxazolins durch Hydrolyse möglich, sodass die "Freilegung" der Carboxylfunktion selektiv erfolgen kann. Hiermit sollte es nach vorheriger Trennung der Diastereomere möglich sein, selektiv eine Säurefunktion freizusetzen (Schema 4.3: I oder II), wodurch die Verbindung **33b** oder **35a** erhalten werden würden. Die freie Säurefunktion könnte dann zum CoA-Ester umgesetzt werden. Somit wäre eine Diskriminierung der beiden Enantiomere auf diesem Wege möglich.



Schema 4.3: Darstellung der Enantiodifferenzierung über eine Diskriminierung der Seitenketten unter Verwendung einer selektiv zu spaltenden Esterfunktion und einer Oxazolin-Schutzgruppe

Um einen chemischen Zugang zu der gewünschten Struktur zu erhalten, sind verschiedene Strategien vorstellbar. Dabei sollte das Chiralitätszentrum stereoselektiv aufgebaut werden (Weg A & B). Ausgehend von der benötigten Struktur sind die verschiedenen Wege im Schema 4.4 dargestellt.



Schema 4.4: Darstellung des Syntheseplans (R: Rest, Et: Ethyl, Me: Methyl)

In einer ersten Route (Weg A, Malonsäurediethylesterroute) sollte dabei vom Malonsäurediethylester **36a** als Edukt ausgegangen werden. Dieser sollte zuerst mit Isoprenylbromid **37** allyliert, anschließend verseift und folgend zur Monocarbonsäure **39** decarboxyliert werden. Nachfolgend sollte dann die Säurefunktion der Carbonsäure mit 2-Methyloxazolin zum Oxazolin-geschützten-β-Ketosäurederivat **40** umgesetzt werden. Über eine Reformatsky-Reaktion an die β-Ketofunktion im sich anschließenden Schritt sollte dann die Generierung des Stereozentrums erfolgen. Hierdurch würde eine Verbindung **34a** mit den zueinander orthogonalen Schutzgruppen Ester und Oxazolin resultieren. Nach Trennung der erhaltenen Diasteromere kann durch selektives Verseifen der Esterfunktion (Schema 4.3: **II**, Verbindung **35a** resultierend) oder Öffnen der Oxazolin-Ringstruktur (Schema 4.3: **I**, Verbindung **33b** resultierend) und nachfolgende Umsetzung der freien Säurefunktion mit CoenzymA an dieser Stelle die Darstellung des jeweiligen Enantiomers erfolgen. Die entsprechende zweite Säurefunktion müsste dann im Anschluss an die CoA-Ester Synthese entschützt werden, um die Verbindung **21a** bzw. **21b** zu erhalten.

In einer zweiten möglichen Route (Weg B, Acetonid-geschützte β -Ketosäureroute) sollte die Acetonid-geschützte β -Ketosäure **41** als Edukt verwendet werden. Diese sollte im ersten Schritt mit Isoprenylbromid **37** allyliert werden. Zum Aufbau des Stereozentrums sollte an dieser Stelle wiederum eine Oxazolin-Spezies verwendet werden. Die Einführung dieser sollte durch eine 1,4-Addition an die Verbindung **42** erfolgen, wodurch das Stereozentrum in hoher Selektivität erhalten werden könnte. Durch das selektive Freilegen der Säurefunktion und die nachfolgende Generierung des CoA-Esters würde auch in diesem Fall jeweils das gewünschte Enantiomer der benötigten Verbindung als CoA-Ester zur Verfügung stehen.

Über eine alternative Route (Weg C, Aceton-dicarbonsäure-diethylesterroute) könnte im Unterschied zu den ersten beiden Synthesewegen eine direkte Darstellung einer Vorstufe **33c** des Hydratase-Produktes/Lyases-Substrates unter Verwendung von Aceton-dicarbonsäurediethylester **44a** erfolgen. Das Alkylbromid **45** sollte dabei in eine metallorganische Spezies überführt und an die Ketofunktion des Esters addiert werden. Diese Synthese bietet den Vorteil, dass das gewünschte Produkt **33c** in nur einer Stufe zugänglich wäre. Allerdings fände hier keine Kontrolle des Stereozentrums statt und das Produkt würde als Enantiomerenmischung erhalten.

4.8.1. Malonsäurediethylesterroute (Weg A)

Über die Malonsäurediethylesterroute sollten Vorstufen dargestellt werden, die für die weitere Synthese der benötigten CoA-Ester **20** und **21** herangezogen werden könnten. Um vom Malonsäuredietylester aus diese Vorstufen zu generieren, wurde zunächst die Synthese von Isoprenylbromid **37** erforderlich. Diese Verbindung **37** wurde durch eine nukleophile Substitution von 2-Methylbut-3-en-2-ol **46** mit Bromwasserstoff dargestellt (Brückner et *al.*, 2008; Vani et *al.*, 2001), wobei eine mit der Literatur vergleichbare Ausbeute von 67 % erreicht werden konnte.



Schema 4.5: Darstellung von Isoprenylbromid 37

Malonsäurediethylester **36a** wurde als Edukt zunächst mit Natriumethanolat deprotoniert und folgend mit Isoprenylbromid **37** allyliert (Cocker et *al.*, 1984). In der Literatur konnte dabei das gewünschte Produkt **38a** mit einer Ausbeute von 58 % dargestellt werden. Durch eine Verlängerung der Reaktionszeit von 6 Stunden auf über Nacht bei Raumtemperatur konnte das Produkt **38a** nun in einer Ausbeute von 85 % erhalten werden.



3.) Rückfluss, 30 min

Schema 4.6: Allylierung des Malonsäurediethylesters 36a mit Natriumethanolat und Isoprenylbromid 37 zur Darstellung von 38a

Die so durch Substitution generierte Verbindung **38a** wurde im Anschluss zunächst mit Natriumhydroxid verseift. In der Reaktion nach Cocker et *al.* (1984), welche in der Literatur eine Ausbeute von 53 % lieferte, zeigte sich unter den angegebenen Bedingungen an dieser Stelle kein zufriedenstellender Umsatz. Durch Erhöhung der Menge an Natriumhydroxid im Ansatz um das 5-fache, konnte schließlich die freie Säure **38b** in einer Ausbeute von 74 % erhalten werden. In der sich anschließenden Decarboxylierung der Dicarbonsäure **38b** unter Einfluss von Pyridin und Erhitzen zum Rückfluss wurde die entsprechende Monocarbonsäure **39** in einer Ausbeute von 92 % dargestellt.



Schema 4.7: Verseifung von 38a zur freien Dicarbonsäure 38b und anschließende Decarboxylierung zu 39

Die so dargestellte freie Monocarbonsäure **39** diente als Ausgangspunkt für die weitere Synthese. Zum Aufbau der β -Ketofunktion sollte eine Umsetzung mit Oxazolin, wie bei Holzwarth (2008) beschrieben, erfolgen. Hierfür wurde 2,2,4-Trimethyl-2-oxazolin **47** zunächst mit *n*-Butyllithium deprotoniert und dann mit der Säure **39** weiter umgesetzt, um die Verbindung **40** zu erhalten. Diese konnte mit einer Ausbeute von 24 % dargestellt werden.



Schema 4.8: Reaktion der Monocarbonsäure 39 mit 2,2,4-Trimethyl-2-oxazolin 47 zu 40

Um eine bessere Ausbeute zu erreichen, sollte im folgenden Verlauf zunächst eine weitere Stufe zwischengeschaltet und die Säure vor der Umsetzung mit Oxazolin verestert werden, um eine bessere Abgangsgruppe zu erhalten. Hierbei sollte eine Säure-katalysierte Veresterung durchgeführt werden. Bei einer solchen Veresterung erfolgt im ersten Schritt die Protonierung der Carbonsäure **48**, wodurch sich ein Mesomerie-stabilisiertes Kation **49** ausbildet. Dieses kann im sich anschließenden Schritt von einem freien Elektronenpaar des Alkohols **50** nukleophil angegriffen werden. Schließlich spaltet sich Wasser aus dem Oxoniumion **51** ab und nach Deprotonierung wird der Ester **52** erhalten (Hauptmann, 1991).



Schema 4.9: Schematische Darstellung einer Säure-katalysierten Veresterung $(R^1, R^2 = H, aliphatischer oder aromatischer Rest)$. Nähere Erläuterungen siehe Text.

An dieser Stelle wurde eine Säure-katalysierte Veresterung nach Itoi et *al.* (1986) mit Ethanol durchgeführt. Leider konnte jedoch kein Produkt erhalten werden. Auch das Erhitzen des Ansatzes unter Rückfluss für 18 Stunden führte nicht zum Erhalt des gewünschten Produktes **53**.



Schema 4.10: Säure-katalysierte Veresterung nach Itoi et al., 1986

Somit wurde nach einer Alternative gesucht. Bei einer Steglich-Veresterung wird die Säure mit Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) und 4-Dimethylaminopyridin (DMAP) als Katalysator zum entsprechenden Aktivester umgesetzt, welcher schnell mit Ethanol zu dem entsprechende Ethylester reagiert. Im Einzelnen wird die Carbonsäure **48** dabei zunächst mit DCC **54** unter Bildung eines *O*-Acylisoharnstoffs **55** umgesetzt (Schema 4.11). Dessen Reaktivität ist dabei vergleichbar mit dem entsprechenden Anhydrid der Säure. Der *O*-Acylisoharnstoff **55** reagiert dann mit dem Katalysator DMAP **56**, der dem Alkohol **50** gegenüber das stärkere Nukleophil darstellt. Es bildet sich ein reaktives Amid ("Aktivester", **57**), welches schnell mit dem Alkohol **50** zu einem stabileren Ester **52** reagiert (http://www.organische-chemie.ch/OC/Namen/steglich-veresterung.htm, Otera, 2003).



Schema 4.11: Mechanismus der Steglich Veresterung (R^1 , $R^2 = H$, aliphatischer oder aromatischer Rest) Nähere Erläuterungen siehe Text.

Bei der an dieser Stelle durchgeführten Steglich-Veresterung mit Ethanol konnte nach Aufreinigung des Rohproduktes über Chromatographie an Kieselgel der entsprechende Ester **53** in einer Ausbeute von 93 % erhalten werden.



Schema 4.12: Darstellung des Ethylesters 53 aus der Monocarbonsäure 39 über eine Steglich-Veresterung

Der erhaltene Ethylester **53** wurde nun weiter mit 2,2,4-Trimethyl-2-oxazolin **47** umgesetzt. Hierfür erfolgte zunächst die Deprotonierung mit *n*-Butyllithium Lösung. Ein nun möglicher nukleophiler Angriff des gebildeten Carbanions erfolgte an dem Carbonyl-Kohlenstoff des Esters. Nach wässriger Aufarbeitung und Aufreinigung des Rohproduktes mittels semipräparativer HPLC wurde das Produkt **40** isoliert. Dabei konnte dieses im Gegensatz zur Reaktion mit der entsprechenden Säure **39** als Edukt in einer Ausbeute von 70 % erhalten werden.



Schema 4.13: Synthese des alkylierten Oxazolins 40, ausgehend von 53 als Ausgangsverbindung

Für den Aufbau des gewünschten Chiralitätszentrums sollte zunächst entsprechend des Syntheseplans (Schema 4.4) eine Reformatsky-Reaktion durchgeführt werden. Durch eine solche Reaktion, welche eine metallorganische Reaktion mit Zink ähnlich der Grignard-Reaktion darstellt, ist die Synthese von β-Hydroxycarbonsäureestern aus Halogenessigsäureestern möglich. Hierbei reagiert Zink mit α -Halogenestern **59** zu den entsprechenden Zink-Organyl, und folgend mit der zugesetzten Carbonylkomponente **58** (http://www.organischechemie.ch/OC/Namen/Reformatsky.htm, Laue & Plagens, 2004). Durch die nukleophile Addition des Reformatsky-Reagenzes an die Carbonylkomponente wird ein Alkoholat **60** gebildet, welches nach wässriger Aufarbeitung den β-Hydroxyester **61** liefert (Schema 4.14).



Schema 4.14: Reformatsky-Reaktion (R^1 , R^2 , R^3 = H, aliphatischer oder aromatischer Rest) Nähere Erläuterungen siehe Text.

Zur Darstellung der hier benötigten Organometallverbindung wurden zunächst Methylenjodid und Samarium erst bei 0 °C und folgend bei RT gerührt. Dann erfolgte die Zugabe der Base 1,3-Dimethyl-3,4,5,6-tetra-hydro-2(1H)-pyrimidinone (DMPU) zur Reaktionsmischung. Im Anschluss wurden die Reaktionspartner Bromessigsäureethylester **62** und die β -Ketoverbindung **40** dem Ansatz zugesetzt (Nagano et *al.*, 2008). Das gewünschte Produkt **34a** konnte nach Aufarbeitung und Aufreinigung über Kieselgel aber leider nicht festgestellt werden.



Schema 4.15: Reformatsky-Reaktion nach Nagano et *al.* (2008) zur Darstellung von 34a unter Verwendung von 40 und 62

Eine Alternative zum Aufbau des gewünschten chiralen Zentrums über die Reformatsky-Reaktion stellt die 1,2-Addition von deprotoniertem Ethylacetat an die Carbonylgruppe dar. Ethylacetat **63** wurde für diese Reaktion mit *n*-Butyllithium deprotoniert, bevor der Reaktion das alkylierte Oxazolin **40** zugesetzt wurde. Das gewünschte Produkt **34a** konnte so jedoch nicht dargestellt werden.



Schema 4.16: 1,2-Addition von deprotoniertem Ethylacetat an das alkylierte Oxazolin 40 zur Darstellung von 34a

Nachdem die Darstellung der gewünschten Struktur unter den hier gewählten Bedingungen weder über eine Reformatsky-Reaktion noch über eine 1,2-Addition mit Ethylacetat möglich war, musste die geplante Syntheseroute (Schema 4.4) umgestellt werden. Nun sollte zunächst über eine HWE-Reaktion (Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion) die Ketofunktion der Verbindung 40 in eine Alken-Seitenkette überführt werden. Die Hydroxygruppe könnte im Anschluss daran in die resultierende Verbindung 64 mittels einer 1,4-Addition von Benzylalkohol und nachfolgender Entschützung eingeführt und somit die Verbindung 34a erhalten werden. Während diese Verbindung 34a als Vorstufe für die Synthese des 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA Esters 21 dient, könnte die Verbindung 64 für die Synthese des Isohexenyl-glutaconyl-CoA Esters 20 herangezogen werden.



Schema 4.17: Modifizierung der Syntheseroute.

Entgegen der zunächst im Schema 4.4 vorgeschlagenen Route über eine Reformatsky-Reaktion soll nun die Darstellung der gewünschten Verbindung **34a** ausgehend vom alkylierten Oxazolin **40** über eine HWE-Reaktion erfolgen.

Bei der Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion handelt es sich um eine Reaktion von Aldehyden oder Ketonen mit stabilen Phosphoryliden zu Olefinen, welche mit einer hohen (*E*)-Selektivität abläuft (http://www.organische-chemie.ch/OC/Namen/Wittig-Horner.htm,

Brückner 2004). In der Reaktion greift das Ylid **66a** als Nukleophil die Carbonylkomponente **58** an (Schema 4.18), wobei die hohe Affinität zwischen dem Sauerstoff und dem Phosphor folgend zu einer Desoxigenierung und dadurch zur Freisetzung der gewünschten Verbindung **70** führt.



Schema 4.18:Angenommener Mechanismus der Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion
 $(R^1, R^2 = H, aliphatischer oder aromatischer Rest)$ N\u00e4here Erl\u00e4uterungen siehe Text.

In dieser Arbeit wurde eine Vorschrift von Trost et *al.* (1987) verwendet, in der zunächst das Ylid aus Diethyl-ethoxy-carbonylmethanphosphat **66** mit Natriumhydrid bei 0 °C generiert wird. Erst mit dem so hergestellten Ylid konnte die Reaktion mit dem alkylierten Oxazolin **40** erfolgen. Auf diesem Wege war es zwar möglich das gewünschte Produkt **64** der Reaktion darzustellen, jedoch lag die Ausbeute bei lediglich 4 %. Auch der Versuch eine Erhöhung der Ausbeute durch Umkehr der Zugabe-Reihenfolge zu erreichen, blieb ohne Erfolg.



Schema 4.19: Einsatz des alkylierte Oxazolins 40 in einer Horner-Wadsworth-Emmons Reaktion zur Darstellung von 64 nach Trost et *al.* (1987)

Die hier eingesetzten weiterführenden Reaktionen ausgehend vom alkylierten Oxazolin **40** lieferten im Falle der Reformatsky-Reaktion bzw. der 1,2-Addition mit deprotoniertem Ethylacetat **63** kein Produkt **34a**. Im Falle der HWE-Reaktion konnte zwar das Produkt **64** dargestellt werden, diese Reaktion lieferte aber lediglich eine sehr schlechte Ausbeute. Da diese Ergebnisse auch nicht durch Modifikationen der entsprechenden Ansätze verbessert werden konnten und daher der Aufbau des chiralen Zentrums auf diesem Wege nicht möglich war, musste diese Route unter Verwendung des Malonsäurediethylesters **36a** und des Oxazolin-Bausteines verworfen werden.

4.8.2. Acetonid-geschützte β -Ketosäureroute (Weg B)

Eine weitere Route, die in dieser Arbeit verfolgt wurde, verwendete die Verbindung **41** als Edukt. Bei dieser Verbindung liegt die β -Ketofunktion mit einer Acetonid-Schutzgruppe vor, was eine höhere Stabilität dieser Funktion gewährleistet.

Die Acetonid-geschützte β -Ketosäure **41** wurde zunächst über die Reaktion von Diketen **71** mit Aceton **72** unter Zugabe von katalytischen Mengen an *p*-Toluensulfonsäure und Erhitzen des Ansatzes unter Rückfluss erhalten (Carrol & Bader, 1953). Während in der Literatur eine Ausbeute von 91 % erreicht werden konnte, ließ sich das gewünschte Produkt **41** nach Destillation hier lediglich in einer Ausbeute von 27 % darstellen. Da das Diketen als Edukt der Reaktion im Folgenden nicht mehr zur Verfügung stand, wurde im späteren Verlauf der Arbeit auf eine kommerziell erhältliche Variante der Verbindung **41** zurückgegriffen.



Schema 4.20: Darstellung der Acetonid-geschützte β-Ketosäure 41 nach Carrol & Bader (1953)

Durch allylische Substitution mit Isoprenylbromid **37** sollte die alkylierte geschützte β -Ketosäure **42** hergestellt werden. Hierfür erfolgte zunächst die Herstellung einer Lithiumdi-*iso*-propylamin (LDA)-Lösung aus Diisopropylamin mit Hilfe von *n*-Butyllithium bei 0 °C. Mit dieser wurde dann bei -78 °C die Acetonid-geschützte β -Ketosäure **41** deprotoniert, bevor die Substitution mit Isoprenylbromid **37** erfolgte. Nach Aufarbeitung der Reaktion und Reinigung mittels Säulenchromatographie konnte das Produkt **42** in einer Ausbeute von lediglich 2 % erhalten werden. Um die Ausbeute zu erhöhen, sollte eine Vorschrift von Graalfs et *al.* (1999) verwendet werden. Nach dieser wurden zunächst DMPU und Diisopropylamin in THF gemischt, bevor das *n*-Butyllithium bei einer Temperatur von -78 °C dem Ansatz zugesetzt wurde. Zu der so hergestellten LDA-Lösung wurde die Acetonid-geschützte β -Ketosäure **41** gelöst in THF langsam zugetropft (-78 °C). Nach 30 min erfolgte die Zugabe von Isoprenylbromid **37** und 14 stündiges Rühren bei RT. Nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel wurde das Produkt **42** in einer Literatur-vergleichbaren Ausbeute von 18 % erhalten.



Schema 4.21: Alkylierung der Acetonid-geschützten β-Ketosäure 41 nach eine Vorschrift von Graalfs et *al.* (1999) zur Generierung von 42

Um das Chiralitätszentrum aufzubauen, sollte im nächsten Reaktionsschritt versucht werden, eine zweite Säurefunktion geschützt als Oxazolinstruktur über eine 1,4-Addition mit Hilfe eines Cuprates **73** einzufügen (**43**, Schema 4.22). Ausgehend von dieser Verbindung **43** könnte durch Entschützen der Acetonid-Struktur die Verbindung **35a** dargestellt werden. Durch das Öffnen der Oxazolin-Struktur würde die entsprechende Dicarbonsäure als Vorstufe des benötigten Hydratase-Produktes/Lyase-Substrates **33a** zur Verfügung stehen. Allerdings wäre durch das selektives Entschützen der Acetonid- (**I**) bzw. der Oxazolin-Struktur (**II**) und die anschließende Veresterung der freien Säurefunktion mit CoenzymA auch hier eine Unterscheidung der beiden Enantiomere auf dieser Stufe möglich. Die entsprechende noch geschützt vorliegende Säurefunktion müsste im Anschluss an die CoA-Ester Synthese freigesetzt werden.



Schema 4.22: Denkbare Darstellung der Verbindungen 35a und 74 als mögliche Vorstufen des Hydratase-Produktes/Lyase-Substrates 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA 21

Um die Anwendbarkeit einer Cuprat-Addition auf derartige Acetonid-geschützte Substrate zu überprüfen, wurde die Verbindung **41** als Testsubstrat verwendet.

Nach der Vorschrift von Organ et *al.* (1994) wurde zur Herstellung des Gilman-Cuprates (Lithiumdibutylcuprat(I), **75**) Kupferjodid (CuI) in trockenem Diethylether suspendiert und für 10 min gerührt. Nach Kühlung auf 0 °C erfolgte die Zugabe von *n*-Butyllithium. Die so hergestellte Cuprat-Lösung wurde auf -78 °C gekühlt und folgend die Acetonid-geschützte β -Ketosäure **41** gelöst in Diethylether vorsichtig zugetropft. Nach zweistündigem Rühren bei -20 °C erfolgte die Zugabe einer 1:1 Ammoniak/Ammoniumchlorid gesättigten Lösung und das Rühren des Ansatzes bis zum Erhalt einer dunkelblauen Farbe. Nach Aufarbeitung der Reaktion und Aufreinigung des Rohproduktes über Säulenchromatographie konnte das gewünschte Produkt **76** aber nicht erhalten werden.



Schema 4.23: Darstellung der Cuprat-Addition von 75 an 41 nach Organ et *al.* (1994), um Verbindunge 76 zu erhalten

Da diese Cuprat-Addition nicht erfolgreich verlief, sollte die 1,4-Addition mit anderen Nukleophilen im Hinblick auf die Einführung einer zweiten Säurefunktion durchgeführt werden. Hierfür wurde Cyanessigsäure **78** ausgewählt, da diese nach der 1,4-Addition durch Decarboxylierung in das entsprechende Nitril **80** überführt und daraus ein Oxazolin **81** als chirales Auxilliar aufgebaut werden kann (Schema 4.24). Durch selektives Entschützen wäre wie bereits zuvor beschrieben eine Differenzierung der beiden Säurefunktionen möglich.



Schema 4.24: Einführung einer zweiten Säurefunktion durch 1,4-Addition von Cyanessigsäure 78 an Verbindung 77 (R=CH₃, aliphatischer oder aromatischer Rest)

Für die Durchführung dieser Reaktion wurde zunächst eine LDA-Lösung vorgelegt und die Cyanessigsäure **78** gelöst in THF vorsichtig bei -78 °C zugesetzt. Die Säure wurde so für 30 min deprotoniert, bevor die Zugabe der Acetonid-geschützten β -Ketosäure **41** erfolgte. Nach 16-stündigem Rühren bei RT folgte die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes, wobei das gewünschte Produkt **84** jedoch nicht erhalten werden konnte.



Schema 4.25: 1,4-Addition von Cyanessigsäure 78 an Verbindung 41

Da die Reaktion mit Cyanessigsäure **78** nicht erfolgreich war, wurde in einer analogen Reaktion nun Cyanessigsäuremethylester **85** an Stelle der Säure eingesetzt. Dies würde bedeuten, dass nach erfolgreicher Reaktion die Esterfunktion zunächst verseift werden müsste, bevor die entsprechende Decarboxylierung der Carboxylfunktion erfolgen könnte. Leider war jedoch auch diese Reaktion nicht erfolgreich. Nach Aufreinigung des Rohproduktes über semi-präparative HPLC konnte auch hier das gewünschte Produkt **86** nicht erhalten werden.



Schema 4.26: 1,4-Addition von Cyanessigsäuremethylester 85 an die Verbindung 41

Eine denkbare Erklärung für dieses Ergebnis wäre die weitere Umsetzung der Verbindung **86** (gewünschtes Produkt) nach erfolgreicher 1,4-Addition zu einem Lacton **87**. Der α -Kohlenstoff der Carbonylgruppe weist eine hohe Azidität auf, wodurch eine Deprotonierung an dieser Stelle möglich ist (**86a**). Aufgrund der Keto-Enol-Tautomerie und einer sich anschließenden Umesterung könnte folgend unter Abspaltung des Alkohols **88** das Lacton (Verbindung **87**) erhalten werden (Schema 4.27).



Schema 4.27: Mögliche ablaufende Reaktion nach 1,4 Addition von Cyanessigsäuremethylester 85 an Verbindung 41 und damit weitere Umsetzung des Produktes 86 zu 87 und 88

Um diese mögliche Reaktion nach Deprotonierung des Ring-Kohlenstoffs zu umgehen, wurde die Versuchsdurchführung modifiziert. Die Acetonid-geschützte β -Ketosäure **41** wurde in THF vorgelegt und auf eine Temperatur von -78 °C gekühlt. Der mittels LDA-Lösung hergestellte deprotonierte Cyanessigsäuremethylester **85a** wurde folgend vorsichtig zu dieser Lösung zugetropft. Nachdem die Reaktion für 16 Stunden gerührt wurde, erfolgte die Aufreinigung über HPLC. Leider führte aber auch diese modifizierte Reaktionsdurchführung nicht zum benötigten Produkt **86**.

Da die vorangegangenen Reaktionen nicht zum gewünschten Ergebnis führten, sollte in einem letzten Versuch Malonsäuredimethylester **36b** mit Natriumhydrid bei 0 °C deprotoniert und zu einer Lösung der Acetonid-geschützte β -Ketosäure **41** in THF getropft werden, um das Produkt **89** darzustellen. Allerdings war auch hier die Substitution an die Acetonid-geschützte β -Ketosäure **41** leider nicht erfolgreich, sodass auch dieser Reaktionsweg verworfen werden musste.



Da eine 1,4-Addition an die als Testsubstrat verwendete Acetonid-geschützte β -Ketosäure 41 schon nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurde vermutet, dass auch eine erfolgreiche Addition an die alkylierte Acetonid-geschützte β -Ketosäure 42 unwahrscheinlich ist. Infolgedessen sollte die Schutzgruppe im Folgenden entfernt werden, um die entsprechende freie β -Ketoverbindung 91 zu erhalten. Diese sollte zum einen zur Darstellung der Vorstufe 92 der Referenzverbindung des Lyase-Produktes 23 dienen, zum anderen sollte versucht werden, von dieser Struktur ausgehend auch die anderen Vorstufen (94, 33a) für die benötigten Strukturen (20, 21) aufzubauen (Schema 4.29).



Die Entschützung erfolgte zunächst mit Benzylalkohol **90** in einer Mikrowellenreaktion (MW). Die Edukte wurden hierfür unter Stickstoffatmosphäre in einem Mikrowellenvial gemischt und in der Mikrowelle auf 115 °C für 1 h erhitzt. Nach Optimierung der Reaktion konnte das Produkt **91** nach Aufreinigung über Säulenchromatographie an Kieselgel in einer Ausbeute von 75 % erhalten werden.



Schema 4.30: Darstellung der Mikrowellenreaktion mit Benzylalkohol 90 zur Entschützung von 42 und Darstellung der freien β-Ketosäure als 91

Die so freigelegte Ketofunktion sollte über eine HWE-Reaktion zunächst in eine Alken-Seitenkette umgewandelt werden (Schema 4.29). Auf dieser Stufe könnte somit nach selektiver Entschützung der Esterfunktionen die Vorstufe für das Hydratase-Substrat **94** erhalten werden. Um dagegen die entsprechende Vorstufe des Hydratase-Produktes/Lyase-Substrates **33a** bereitzustellen, wäre die Einführung einer Hydroxyfunktion erforderlich. Dies könnte über eine 1,4-Addition von Allylalkohol (2-Propen-10l) und eine sich anschließende Verseifung erreicht werden (Schema 4.29).

In Vorversuchen wurde Acetessigsäuremethylester **96** als Modellsubstrat anstelle der Verbindung **91** eingesetzt. Mit Hilfe dieser Verbindung sollte die Anwendbarkeit der HWE-Reaktion getestet werden. Eine entsprechende Reaktion nach Yamagiwa et *al.* (1996) mit Diethyl-ethoxy-carbonyl-methanphosphat in Toluol war an dieser Stelle jedoch nicht erfolgreich und das Produkt **97** konnte nicht erhalten werden. Auch über die Vorschrift von Trost et *al.* (1978), bei der eine Reaktion des Acetessigsäuremethylesters **96** mit Diethyl-ethoxy-carbonyl-methanphosphat und Natriumhydrid in DMF erfolgen sollte, gelang es nicht das Produkt **97** der HWE-Reaktion darzustellen.

Erst bei der Verwendung einer Arbeitsvorschrift von Machleidt et *al.* (1963) bei der die benötigte Ylid-Lösung aus Triphenylphosphin (PPh₃) und Bromessigsäureethylester **62** generiert, das resultierende Phosphonat mit Natriummethanolat (NaOMe) deprotoniert und nach Zugabe von Acetessigsäuremethylester **96** für 16 Stunden erwärmt wurde (90 °C), konnte das gewünschte Produkt **97** in einer Ausbeute von 12 % erhalten werden.



Schema 4.31: HWE-Reaktion nach Machleidt et al. (1963) zur Darstellung von 97 aus 62 und 96

Im weiteren Verlauf wurde der β -Ketobenzylester **91** in einer HWE-Reaktion nach Machleidt et *al.* (1963) eingesetzt. Allerdings konnte bei analoger Reaktionsführung das entsprechende Produkt **93** nicht erhalten werden.



Schema 4.32: HWE-Reaktion an die β-Ketoposition des Benzylesters 91 nach Machleidt et *al.* (1963) zur Synthese von 93

Um die gewünschte Verbindung (Vorstufe Hydratase-Produkt/Lyase-Substrat **33a**) dennoch darstellen zu können, sollte nun eine Reformatsky-Reaktion durchgeführt werden. Mit der Modellverbindung Acetessigsäuremethylester **96** wurde die Möglichkeit dieser Reaktion nach einer Vorschrift von Schmidt (2008, Le Mignot et *al.*, 1998) zunächst getestet. Zink, Tri-*n*-butylphosphin (PBu₃) und Bromessigsäureethylester **62** wurden in absolutem Dioxan gemischt und der Ansatz nach Zugabe des Methylesters **96** unter Rückfluss für 16 Stunden erhitzt. Nach Aufreinigung des Rohproduktes über Säulenchromatographie an Kieselgel und semi-präparativer HPLC konnte das Produkt **98** in einer Ausbeute von 48 % erhalten werden. Zusätzlich wurde eine weitere Verbindung **99** isoliert. Die Ausbeute des durch eine Umesterung erhaltenen Nebenproduktes betrug 9 %.



Schema 4.33: Reformatsky-Reaktion nach Schmidt (2008) mit Acetessigsäuremethylester 96 als Modellsubstrat, wobei neben dem Produkt der Reaktion 98 auch das Nebenprodukt 99 isoliert werden konnte.

Da die Testreaktion erfolgreich verlief, konnte die Reaktion im Anschluss mit dem eigentlichen Edukt, dem Benzylester 91, durchgeführt werden. Leider war es aber auch in diesem Fall trotz analoger Reaktionsdurchführung nicht möglich, das gewünschte Produkt 100 darzustellen.



Schema 4.34: Reformatsky-Reaktion nach Schmidt (2008) mit dem eigentlichen Edukt 91

Die Entschützung der Acetonid-geschützten β -Ketosäure **42** erfolgte zunächst mit Benzylalkohol **90**, wodurch das Produkt in guten Ausbeuten erhalten werden konnte. Die nachfolgenden Reaktionen mit dem vorliegenden Benzylester **91** verliefen jedoch nicht erfolgreich und somit konnten die benötigten Produkte auf diese Weise nicht dargestellt werden. Um auszuschließen, dass eventuell der Benzylrest die Reaktionen störte, sollte eine andere Esterfunktion im Folgenden verwendet werden.

Die Reaktion in der Mikrowelle mit der alkylierten Acetonid-geschützten β -Ketosäure 42 wurde daher nun unter Verwendung von *tert*-Butanol 101 durchgeführt. Nach Aufreinigung des Reaktionsansatzes konnte der entsprechende *tert*-Butylester 102 als Produkt erhalten werden. Während jedoch bei der Verwendung des Benzylalkohols 90 eine Ausbeute von 75 % erreicht werden konnte, lag diese hier bei lediglich 12 %.

Da es sich bei dem eingesetzten Edukt um eine sehr stabile Verbindung handelte, sollte diese durch Zugabe von Lewis Säuren aktiviert werden, um eine bessere Reaktion mit dem *tert*-Butanol **101** zu ermöglichen. Somit wurde zum einen die Zugabe von Lithiumchlorid und zum anderen die Zugabe von Zinkchlorid zum Reaktionsansatz getestet (10 Mol %). Nachdem aber eine Optimierung und damit eine signifikant höhere Ausbeute der Reaktion weder durch Zugabe von Lithium- noch von Zinkchlorid bewirkt werden konnte, sollte dies durch Erhöhung der Reaktionszeit von 15 auf 60 Minuten erreicht werden. Durch diese Modifizierung wurde allerdings lediglich eine leicht erhöhte Ausbeute von 19 % erhalten.



Schema 4.35: Darstellung der Reaktion mit *tert*-Butanol 101 und alkylierter Acetonid-geschützter β-Ketosäure 42 zur Synthese der *tert*-Butylesters 102

Um einen direkten Zugang zum entsprechenden *tert*-Butylester **102** zu erhalten, wurde nach einer Vorschrift von Yang et *al.* (2002) *tert*-Butylacetoacetat **103** als Edukt eingesetzt. In dieser Reaktion wurde das Edukt **103** zunächst durch Zugabe von Natriumhydrid und *n*-Butyllithium deprotoniert, sodass im Anschluss eine Substitution an Isoprenylbromid **37** erfolgen konnte. Das Produkt **102** wurde nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel in einer Ausbeute von 70 % erhalten. Im Vergleich zur Entschützung von Verbindung **42** in der Mikrowellenreaktion konnte die Ausbeute damit deutlich erhöht werden. Ferner konnte für den folgenden Verlauf der Arbeit ein direkter Zugang zu **102** erhalten werden, wobei die Synthese und die Alkylierung der Acetonid-geschützten β -Ketosäure **41**, sowie die Öffnung der Struktur hier eingespart werden konnten.



Schema 4.36: Darstellung des benötigten tert-Butylesters 102 nach Yang et al., 2002

Die Einführung des zweiten Esters sollte mit einer Reformatsky-Reaktion erfolgen. Nach einer Reaktionsvorschrift von Adams & Van Duuren (1953) wurde Zink in Benzol suspendiert, anschließend Bromessigsäureethylester **62** und *tert*-Butylester **102** vorsichtig zugetropft und die Reaktionsmischung für 16 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Aufarbeitung der Reaktion und Reinigung des erhaltenen Rohproduktes über Kieselgel konnte das Produkt **104** jedoch nicht erhalten werden.



Schema 4.37:Reformatsky-Reaktion nach Adams & Van Duuren, 1953Zur Darstellung von 104 wurden tert-Butylesters 102 und Bromessigsäureethylester 62 als
Edukte eingesetzt.

Um auszuschließen, dass das verwendete Zinkpulver bereits passiviert vorlag, sollte im Folgenden der durch Adams & Van Duuren (1953) beschriebene Versuch mit gereinigtem Zinkpulver reproduziert werden. Hierzu wurde das Zink mit HCl und folgend mit dest. Wasser, Aceton und Diethylether gewaschen (Newman & Evans Jr., 1955; Nakamura, 2002). Das so aktivierte Zink wurde dann in die Reaktion mit Bromessigsäureethylester **62** und Acetessigsäureethylester **105** eingesetzt (Adams & Van Duuren, 1953). Die Reaktionsmischung wurde für 2 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Ein Umsatz konnte jedoch nicht festgestellt werden.



Schema 4.38: Reformatsky-Reaktion an Acetessigsäureethylester 105 durch Bromessigsäureethylester 62 nach Adams & Van Duuren, 1953

Da eine Aktivierung von elementarem Zinkpulver über das Waschen mit HCl nicht das gewünschte Ergebnis brachte, sollte das Zink aus Zinkchlorid mit Lithium im Ultraschallbad frisch reduziert werden (Rieke Zink, Nakamura, 2002).

In der Literatur war eine Reformatzky-Reaktion mit so aktiviertem Zink unter Verwendung von Benzaldehyd **106** als Edukt bekannt (Schema 4.39) (Boudjouk et *al.*, 1986; Nakamura, 2002).



Schema 4.39: Reformatzky-Reaktion nach Boudjouk et al., 1986

Unter Reaktionsbedingungen sollten nun der tert-Butylester analogen 102 und Bromessigsäureethylester 62 umgesetzt werden. Hierzu wurde das Zinkchlorid zunächst getrocknet und in THF gelöst. Nach Reduktion des Zinkchlorids mit Hilfe von elementarem Lithium unter Ultraschall wurde die feine graue Suspension auf 0 °C gekühlt. Dann folgte die Zugabe des Bromessigsäureethylesters 62 und des tert-Butylesters 102. Der Ansatz wurde folgend für 18 Stunden bei RT gerührt. Nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel konnte das Produkt 104 in Spuren erhalten werden. Da die Menge für eine weitere Aufreinigung mittels semi-präparativer HPLC zu gering war, wurde die Probe lediglich mittels ¹H-NMR und GC-MS analysiert. In der GC-MS Analyse konnten dabei Produktfragmente gefunden werden und die NMR Analyse ließ das gewünschte Produkt vermuten. Leider war der Ansatz sowohl im vergleichbaren als auch im größeren Maßstab nicht reproduzierbar und das entsprechende Produkt konnte durch diese Reaktionen nicht wieder dargestellt werden. Trotz der zuvor erhaltenen positiven Ergebnisse war es somit durch das Fehlen der vollständigen Analytik im weiteren Verlauf nicht möglich, die gewünschte Verbindung und damit den Erfolg der Reaktion zu bestätigen.



Schema 4.40: Darstellung der Reformatsky-Reaktion mit *tert*-Butylester 102 und Bromessigsäureethylester 62 als Edukte unter Verwendung von Rieke Zink (Zn*)

Um die Ausbeute zu erhöhen und somit eine vollständige Analytik zu ermöglichen, sollte die Reaktion des Weiteren mit frisch getrocknetem Zinkchlorid und mit Lithium-Naphthalid wiederholt werden. Hierfür erfolgte die Reaktion wie zuvor beschrieben, lediglich mit dem Unterschied, dass das Zinkchlorid mit Lithium-Naphthalid reduziert wurde. Das so aktivierte Zink wurde in die Reaktion eingesetzt. Nach Aufarbeitung der Reaktion und Aufreinigung konnte das gewünschte Produkt **104** aber nicht erhalten werden. Um die Reaktionsbedingungen zu überprüfen, wurde nun eine Test-Reaktion mit Acetessigsäuremethylester **96** als Edukt durchgeführt. Allerdings konnte auch hier nach Aufarbeitung der Reaktion das Produkt **98** nicht erhalten werden. Weder Variationen der Reaktionszeit noch Veränderungen in der Aufarbeitung zeigten Erfolg.



Schema 4.41: Darstellung der Reformatzky-Reaktion mit Rieke Zink und Acetessigsäuremethylester 96 als Modelverbindung

Um auszuschließen, dass das gebildete Produkt **104** nicht stabil ist, sollte im Anschluss versucht werden, die neu gebildete Hydroxy-Funktion direkt mit Trimethylsilylchlorid (TMS-Cl) zu schützen. Die Reaktion wurde also wie bereits zuvor beschrieben durchgeführt, lediglich mit dem Unterschied, dass nach Zugabe der Edukte **102** und **62** TMS-Chlorid dem Ansatz zugesetzt und dieser über Nacht gerührt wurde. Nach Aufarbeitung der Reaktion und Aufreinigung des Rohproduktes über Säulenchromatographische Trennung an Kieselgel konnte das gewünschte Produkt **108** aber leider nicht erhalten werden.



Schema 4.42: Versuch der Stabilisierung des Produktes der Reformatsky-Reaktion als TMS-Ether 108

Im Verlauf der Arbeit wurden weitere Versuche unternommen, eine Addition von Bromessigsäureethylester **62** an die β -Ketoposition des *tert*-Butylester **102** durchzuführen (Tab. 4.11).

Tab. 4.11:Zusammenfassung der Daten der durchgeführten Reaktionen zur Addition von
Bromessigsäureetylester 62 an die β-Ketoposition des *tert*-Butylesters 102

	Ĺ	102	Br 0 62			0 0H	\langle
	Metall	Lösungsmittel	Temperatur	Zeit	Additiv	Umsatz	Literatur
1.	ZnCl ₂ Li	THF Et ₂ O	0° C - RT	ü. N.	-	-	Boudjouk et al., 1986
2.	Zn	THF	RT	ü. N.	BiCl ₃	-	Wada et <i>al</i> ., 1997
3.	Indium	THF/H ₂ O	30 °C	ü. N.	-	-	Kumar et <i>al</i> 2002
4.	Zn	THF	Rückfluss	ü. N.	Iod	-	Hou, 2003
5.	Zn	Benzol	Rückfluss	ü. N.	Cu	-	Nieuwland & Daly 1931
6.	Zn	Dioxan	Rückfluss	ü. N.	PBu ₃	"+"	Schmidt, 2008

Legende: - : kein Zusatz eines Additivs bzw. kein Umsatz,

"+": das Produkt der Reaktion konnte nicht dargestellt werden, jedoch war es möglich eine Verbindung zu isolieren (Nähere Erläuterungen siehe Text).

Eine Möglichkeit für eine solche Addition wurde von Wada et *al.* (1997) unter Zusatz von Bismutchlorid in einer Reformatsky-Reaktion beschrieben. Entsprechend dieser Vorschrift wurde für die Reaktion (Tabelle 4.11, 2.) Zink und Bismut-trichlorid in absolutem THF suspendiert und mit Bromessigsäureethylester **62** und *tert*-Butylester **102** versetzt. Der Ansatz wurde dann für 16 Stunden bei RT gerührt. Leider konnte jedoch in diesem Fall kein Umsatz des *tert*-Butylesters **102** zum entsprechenden Produkt **104** festgestellt werden.

Einen weiteren Ansatz zur 1,2-Addition an den β -Ketoester stellte die stöchiometrische Verwendung von elementarem Indium nach Kumar et *al.* (2002) dar (Tab. 4.11, 3.). Hierfür wurden die Edukte *tert*-Butylester **102** und Bromessigsäureethylester **62** in einem THF:Wasser-Gemisch gelöst, bevor die Zugabe des Indiums zum Ansatz erfolgte. Die Reaktionsmischung wurde bei 30 °C über Nacht gerührt. Nach Aufarbeitung der Reaktion und Aufreinigung der Probe mittels Säulenchromatographie konnte jedoch das gewünschte Produkt **104** nicht festgestellt werden.

In einem anderen Versuch erfolgte die Reaktion von Bromessigsäureethylester **62** mit dem *tert*-Butylester **102** in Gegenwart von Zink und Iod in absolutem THF (Tab. 4.11, 4.). Für diese Reaktion wurden zunächst Zink und Jod für 20 min bei RT gerührt. Nach Zugabe von absolutem THF und Bromessigsäureethylester **62** zur Reaktionslösung wurde diese kurz aufgekocht, bevor die Zugabe des *tert*-Butylesters **102** erfolgte (Hou, 2003). Der Ansatz wurde folgend für 18 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Leider war aber auch diese Reaktion nicht erfolgreich.

Da auch diese Reaktion kein Produkt lieferte, sollte mit Hilfe einer Synthesevorschrift nach Nieuwland & Daly (1931) nun die Zielverbindung dargestellt werden (Tab. 4.11, 5.). Hierbei wurde durch die Zugabe von Kupfer zum Reaktionsansatz eine zusätzliche Aktivierung und damit ein begünstigter Ablauf der angegebenen Reaktion beschrieben. Entsprechend dieser Vorschrift wurde daher der *tert*-Butylester **102** mit Bromessigsäureethylester **62** sowie Zink und Kupfer in Benzol gemischt und für 18 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Aufarbeitung der Reaktion und Reinigung des Rohproduktes mittels Säulenchromatographie an Kieselgel konnte das gesuchte Produkt **104** folgend aber nicht identifiziert werden.

Im weiteren Verlauf sollte eine bereits erfolgreich im Arbeitskreis eingesetzte Variante zur Durchführung einer Reformatsky-Reaktion unter Zusatz von Tributylphosphin getestet werden (Schmidt, 2008). Hierfür wurde zunächst eine Zink-Suspension in absolutem Dioxan hergestellt, zu welcher folgend Tri-*n*-butylphosphin (PBu₃) und Bromessigsäureethylester **62** zugetropft wurden. Nach Zugabe des *tert*-Butylesters **102** erfolgte das Erhitzen des Ansatzes unter Rückfluss für 18 Stunden (Tab. 4.11, 6.). Nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel konnte das gewünschte Produkt **104** allerdings nicht isoliert werden. Stattdessen wurde der Ethylester **110** als einziges Produkt erhalten (23 % Ausbeute). Dies lässt sich durch eine stattfindende Retro-Reformatsky-Reaktion erklären (Schema 4.43). Bei dieser erfolgte zunächst die Knüpfung der C-C Bindung an der Ketoposition. Das gebildete Intermediat **109** ist jedoch nicht stabil und es kommt zum Abspalten des verkürzten *tert*-Butylesters **111**.



Schema 4.43: Darstellung der Retro-Reformatsky-Reaktion Durch Addition von Bromessigsäureethylester 62 an die Ketoposition des Eduktes 102 wird das Intermediat 109 gebildet. Dieses ist jedoch nicht stabil und es kommt zur Spaltung der C C Bindung. Dabei sind zwei mögliche Spaltungsreaktionen denkbar. Zum einen ist die Spaltung der neu gebildeten Bindung möglich (II), wobei die Edukte 102 und 62 erhalten werden. Bei der Retro-Reformatsky-Reaktion kommt es jedoch zur Spaltung einer C-C Bindung in der Edukt-Struktur (I), sodass die Produkte 110 und 111 isoliert werden können.

Zusammenfassend muss für das Kapitel 4.8.2. festgehalten werden, dass diese erhaltenen Daten auf eine Instabilität der Zielverbindung **104** hindeuten. Aufgrund der Instabilität kommt es zum Ablauf weiterer Reaktionen bzw. intramolekularer Umlagerungen, sodass in der Reaktion stabile Produkte erhalten werden, welche jedoch nicht der gewünschten Zielverbindung entsprechen.

Für die Enzymreaktionen, welche im biologischen Teil untersucht werden, könnte dies bedeuten, dass somit auch die natürliche Verbindung das Produkt der Hydratase und somit das Substrat der Lyase **21** nicht stabil ist und daher nur als kurzlebiges Intermediat vorliegt.

Um das Intermediat **109** als greifbare Verbindung zu erhalten, wurde in einem neuen Ansatz versucht, dieses durch Zugabe von TMS-Chlorid als TMS-Ether **108** zu stabilisieren. Leider verlief jedoch auch dieser Versuch erfolglos.



Schema 4.44: Versuch der Stabilisierung des Intermediats 109 der Reformatsky-Reaktion durch Zugabe von TMS-Cl zum Reaktionsansatz

Um die unerwünschte Spaltungsreaktion zu vermeiden, sollte versucht werden 2-Methyloxazolin 47 an die β -Ketofunktion des *tert*-Butylester 102 zu addieren. Hierfür wurde das Oxazolin 47 zunächst mit *n*-Butyllithium deprotoniert, bevor die Zugabe des Esters 102 erfolgte (Meyers et *al.*, 1974). Nach Aufreinigung des Rohproduktes über Säulenchromatographie an Kieselgel konnten geringe Mengen der gewünschten Verbindung 112 festgestellt werden. Die Reaktion lieferte das Produkt 112 mit einer Ausbeute von 15 %.



Schema 4.45: Addition von Oxazolin 47 an die β-Ketofunktion des *tert*-Butylester 102 nach Meyers et *al.*, 1974

Auf eine Optimierung der Reaktion wurde an dieser Stelle allerdings verzichtet, da mit der Geranylsäureroute (Weg D) ein weiterer vielversprechender Syntheseplan für die Synthese der Vorstufen für die Verbindungen **20** (Hydratase-Substrat) und **21** (Hydratase-Produkt/Lyase-Substrat) zur Verfügung stand. In den entsprechend parallel durchgeführten Versuchen konnten bereits gute Ergebnisse erzielt werden (Kap.4.8.4.), sodass die Arbeiten am hier untersuchten Syntheseweg (Abb. 4.29) nicht weiter verfolgt wurden.

4.8.3. Aceton-dicarbonsäure-diethylesterroute (Weg C)

Eine direkte Synthese der racemischen Vorstufe des Hydratase-Produktes/Lyase-Substrates sollte vom Aceton-dicarbonsäure-diethylester **44a** ausgehen. Da dieses Edukt kommerziell erhältlich ist, wäre das gewünschte Produkt **33c** in lediglich einer Stufe zugänglich.

Für diese Reaktion wurde zuerst Lithium-Naphthalid hergestellt und mit Homoisoprenylbromid **45** zur entsprechenden Lithium-Verbindung umgesetzt. Diese metallorganische Verbindung sollte in einer 1,2-Addition an die zentrale Ketofunktion des Acetondicarbonsäure-diethylesters **44a** addiert werden. Bei dem Produkt **33c** müssten lediglich die Esterbindungen verseift werden und die Dicarbonsäure **33a** als Vorstufe für das nötige Substrat würde zur Verfügung stehen.

In der vorliegenden Arbeit konnte aber bereits die 1,2-Addition nicht erfolgreich durchgeführt werden, sodass das gewünschte Produkt auf diese Weise nicht dargestellt werden konnte.


Schema 4.46: Versuch der direkten Synthese der Vorstufe des Hydratase-Produktes/Lyase-Substrates 33c ausgehend vom Aceton-dicarbonsäure-diethylester 44a

4.8.4. Geranylsäureroute (Weg D) - Syntheseplan in Anlehnung des in der Natur ablaufenden Weges

In der Natur ist der Abbau linearer Terpenoide und Terpensäuren durch eine β -Methylgruppe erschwert, da diese den Abbau über die β -Oxidation verhindert. Die in dieser Arbeit betrachteten Organismen *P. aeruginosa* und *P. citronellolis* umgehen die Blockierung der β -Oxidation durch Veränderung dieser Methylgruppe. Auf Stufe des CoenzymA-Esters **19** wird die Methylgruppe in β -Position zunächst carboxyliert (**20**). Durch Einführung einer Hydroxyl-Gruppe in 1,4 Position zur Thioesterfunktion (**21**) werden dann die Voraussetzungen für die Abspaltung der Acetat-Funktionalität geschaffen. Nach Abspaltung des Acetats **22** steht folgend eine Verbindung **23** zur Verfügung, welches nun weiter über die β -Oxidation umgesetzt werden kann (Schema 4.47).



Schema 4.47: Umgehen der Blockierung der β-Oxidation in *P. aeruginosa* und *P. citronellolis* durch Carboxylierung der störenden β-Methylgruppe (Kreismarkierung), Einführung einer Hydroxyl-Gruppe und Abspaltung von Acetat 22 (schematische Darstellung)

Da eine direkte Synthese der Vorstufe des Hydratase-Produktes/Lyase-Substrates **33** nicht erfolgreich war, sollte eine Syntheseroute, in Anlehnung an den in der Natur verwendeten Weg, von der Geranylsäure **8** ausgehen (Schema 4.48).



Schema 4.48: Synthese der benötigten Vorstufen 114 und 33 ausgehend von der Geranylsäure 8.

In einem ersten Schritt war es erforderlich die Säure (*cis/trans*-Gemisch) zum Methylester **115** zu verestern. Da im Verlauf der Arbeit schon gute Ausbeuten mit Hilfe der Steglich-Veresterung erhalten werden konnten, sollte diese auch im Falle der Geranylsäure **8** getestet werden. Nach Veresterung der Säure **8** mit Methanol konnte der entsprechende Methylester **115** mit einer Ausbeute von 98 % erhalten werden.



Schema 4.49: Veresterung der Geranylsäure 8 unter Steglich-Bedingungen.

Bei Saito et *al.* (2000) gelang eine neue regio- und stereoselektive Substitution an der Methylgruppe von α,β -ungesättigten Carbonyl-Verbindungen unter Verwendung von Aluminium-Tris-2,6-diphenylphenoxide (ATPH). Aufgrund der ausladenden Struktur dieses Schlüsselreagenzes (Abb. 4.92) wird der Zugang zum entsprechend gebunden Edukt lediglich aus einer bestimmten Richtung ermöglicht (sterische Interaktion).



Abb. 4.92: Molekulare Struktur von ATPH aus Saito et al., 2000

Mit Hilfe dieser Arbeitsvorschrift sollte in der vorliegenden Arbeit nun die Derivatisierung der β-Methylgruppe des Geranylsäuremethylesters **115** erreicht werden. Um eine spätere selektive Spaltung von nur einer Esterfunktion und somit eine Unterscheidung der Enantiomere auf Stufe der Verbindung **33** zu ermöglichen, sollte der Versuch unternommen werden, eine zweite Esterfunktion in Form eines Allylester an dieser Stelle einzufügen. Hierfür wurde zunächst die ATPH-Lösung aus 2,6 Diphenylphenol und Trimethylaluminium hergestellt, zu welcher dann bei einer Temperatur von -78 °C die Edukte Geranylsäuremethylester **115** und Allylchlorformiat (Alloc-chlorid) **116** zugesetzt wurden. Die Zugabe der Lithium-2,2,6,6-tetramethylpiperid-Lösung (LTMP), welche aus 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin und *n*-Buthyllithium generiert wurde (-78 °C, 30 min), erfolgte im Anschluss. Das Produkt **117** konnte nach Aufarbeitung der Reaktion und Reinigung über Kieselgel allerdings lediglich mit einer Ausbeute von 15 % erhalten werden (Schema 4.50).



Schema 4.50: Funktionalisierung der β-Methylgruppe des Geranylsäuremethylesters 115 in Anlehnung an Saito et *al.*, 2000

Trotz erneuter Aufreinigung sämtlicher Edukte wurde keine Erhöhung der Ausbeute erreicht. Auch der Einsatz anderer Basen wie LiHMDS und LDA zur Deprotonierung der Methylgruppe führten leider nicht zum Erfolg. In einem nächsten Schritt sollte daher der Erfolg der Deprotonierung in einem Deuterierungsexperiment geprüft werden (Schema 4.51). Hierzu wurde auf den Zusatz der ATPH-Lösung und somit auf einen regioselektiven Verlauf verzichtet. Für dieses Experiment wurde der Geranylsäuremethylester **115** mit LTMP bzw. LiHMDS deprotoniert und anschließend mit Deuteriumoxid (D₂O) deuteriert.



Schema 4.51: Darstellung des Deuterierungsexperimentes mit Geranylsäuremethylester 115 zur Kontrolle der Deprotonierung der β-Methylgruppe

Bei diesem Experiment zeigte sich (Abb. 4.93), dass das Signal der für den Methylester **115** typischen Methylgruppe 3 bei der Deprotonierung mit LTMP annähernd vollständig verschwunden war. Im Gegensatz dazu war bei der Deprotonierung mit LiHMDS das zu 3 gehörende Signal noch deutlich intensiver. Diese Beobachtungen spiegelten sich auch in den Intensitäten der Signale für 2' und 3' des Produktes wider. Diese waren bei der Deprotonierung mit LTMP deutlich stärker ausgeprägt. Hieraus ließ sich schlussfolgern, dass die Deprotonierung mit LiHMDS zum größten Teil und mit LTMP nahezu vollständig ablief. Damit stellte dieser Teilschritt für den Reaktionsablauf kein Problem dar.



Abb. 4.93: NMR Experiment zur Deprotonierung des Geranylsäuremethylesters 115 Bezeichnungen der Signale sind in der entsprechenden Reaktionsgleichung (Schema 4.51) zu finden.

Daher sollte im Folgenden die Addition von Allylchlorformiat **116** an Geranylsäuremethylester **115** mit LTMP als Base wiederholt werden, wobei die Reaktion zunächst für 2 Stunden deprotoniert und folgend unter thermodynamischen Bedingungen mit einem Überschuss an Allylchlorformiat **116** kinetisch abgefangen werden sollte. Eine Verbesserung der Ausbeute konnte jedoch auch bei diesem Versuch nicht erreicht werden. Die Reaktion lieferte das Produkt **117** in einer Ausbeute von 11 %. Da mit Allylchlorformiat bisher keine besseren Ausbeuten erzielt werden konnten, wurden im weiteren Verlauf andere Carbonylverbindungen getestet.

In einem ersten Versuch sollte Benzaldehyd **106** an Stelle des Allylchlorformiats **116** in die Reaktion eingesetzt werden, wobei ansonsten wie bereits beschrieben, nach der Vorschrift von Saito et *al.* (2000) verfahren wurde. Das gewünschte Produkt **119** konnte nach Aufarbeitung der Reaktion, Reinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel und einer anschließenden HPLC mit einer Ausbeute von 21 % dargestellt werden.



Schema 4.52: Funktionalisierung der β-Methylgruppe des Geranylsäuremethylesters 115 in Anlehnung an Saito et *al.* (2000) unter Einsatz von Benzaldehyd 106

Als eine weitere Alternative zu Allylchlorformiat **116** wurde Benzylisocyanat **120** unter denselben Reaktionsbedingungen getestet. Allerdings konnte das gewünschte Produkt **121** in dieser Reaktion nach Aufarbeitung und Aufreinigung nicht isoliert werden.



Schema 4.53: Funktionalisierung der β-Methylgruppe des Geranylsäuremethylesters 115 in Anlehnung an Saito et *al.* (2000) unter Verwendung von Benzylisocyanat 120

In sich anschließenden Reaktionen wurden anstelle des Allylchlorformiats **116** zum einen gasförmiges Formaldehyd und zum anderen das Polymer Paraformaldehyd selbst in der Reaktion eingesetzt. Für ersteres wurde die Reaktion wie bereits beschrieben angesetzt, wobei der gasförmige Formaldehyd aus Paraformaldehyd durch thermische Zersetzung hergestellt und in die Reaktionsmischung eingeleitet wurde. Nach Aufarbeitung und Reinigung des Ansatzes über Säulenchromatographie an Kieselgel konnte das entsprechende Produkt **122** in einer Ausbeute von 6 % isoliert werden.



Schema 4.54: Funktionalisierung der β-Methylgruppe des Geranylsäuremethylesters 115 in Anlehnung an Saito et *al.* (2000) mit Hilfe von gasförmigem Formaldehyd

Wurde anstatt des Formaldehyds das Polymer Paraformaldehyd in der Reaktion eingesetzt, so konnte im Gegensatz dazu nach Aufreinigung das Produkt **122** mit einer Ausbeute von 26 % erhalten werden.



Schema 4.55: Funktionalisierung der β-Methylgruppe des Geranylsäuremethylesters 115 unter Zuhilfenahme von Paraformaldehyd nach der Arbeitsvorschrift von Saito et *al.*, 2000

Eine weitere Möglichkeit zur Einführung der zweiten Säurefunktion an die β -Methylgruppe des Geranylsäuremethylesters **115** stellte der Einsatz von Di-*tert*-butyldicarbonat **123** dar. Unter Verwendung dieser Verbindung, sollte die Einführung der *tert*-Butyloxycarbonyl-Gruppe (Boc-Gruppe), eine der häufigsten eingesetzten Schutzgruppen in der organischen Chemie, erfolgen. Leider konnte das gewünschte Produkt **124** nach Aufreinigung nur in Spuren festgestellt, aufgrund einer zu geringen Ausbeute jedoch nicht isoliert werden. Diese Reaktion musste zu diesem Zeitpunkt somit verworfen werden.



Schema 4.56: Einführung einer Säurefunktion an der β-Methylgruppe des Geranylsäuremethylesters 115 durch Einsatz von Di-*tert*-butyldicarbonat 123 in der Reaktion nach Saito et *al.*, 2000

Auch wenn durch einige der oben aufgeführten Reaktionen erfolgreich das jeweilige Produkt dargestellt werden konnte, so stellte doch die direkte Addition von CO_2 an die Methylgruppe den elegantesten Zugang dar. Diese Reaktion bot den Vorteil, dass eine Synthesestufe

eingespart werden konnte, da keine weitere Entschützung oder Oxidation nötig wurde. Für die Reaktion erfolgte zunächst das Trocknen des CO_2 Gases, bevor dieses im Abschluss in die Reaktionsmischung geleitet wurde. Nach Aufarbeitung des Ansatzes konnte das gewünschte Produkt **125** der Reaktion ohne weitere Reinigung in einer Ausbeute von 93 % erhalten werden.



Schema 4.57: Carboxylierung der β-Methylgruppe des Geranylsäuremethylesters 115 in einer Reaktion nach Saito et *al.*, 2000

Somit war es nun möglich eine Vorstufe des benötigten Hydratase-Substrates **20** in einer sehr guten Ausbeute von 93 % darzustellen.

An diese Reaktion anschließend sollte nun die Darstellung der entsprechenden Vorstufe des Hydratase-Produktes/Lyase-Substrates (21) über eine 1,4-Addition von Hydroxid-Ionen durchgeführt werden. Hierfür wurde die Verbindung 125 in absolutem DMSO gelöst und mit Lithiumhydroxid bei RT behandelt. Nach sich anschließender Aufarbeitung konnte das gewünschte Produkt 126 aber leider nicht erhalten werden.



Schema 4.58: Darstellung der Verbindung 126 als eine Vorstufe des Hydratase-Produktes/Lyase-Substrates 21 über eine 1,4-Addition von Lithiumhydroxid an die Verbindung 125

Aus Zeitgründen war es an dieser Stelle nicht mehr möglich, weitere Versuche zur Darstellung der Vorstufe des Hydratase-Produktes/Lyase-Substrates **126** durchzuführen. Die hier erörterte Syntheseroute konnte lediglich bis zum Erhalt der Vorstufe des Hydratase-Substrates (Verbindung **123**) verfolgt werden. Weitergehende Untersuchungen müssen im Rahmen einer anderen Arbeit erfolgen.

4.8.5. Darstellung von Vorstufen der Intermediate des "lower atu pathways"

4.8.5.1. Trennung von *cis*- und *trans*-Geranylsäure und Darstellung der Vorstufe des Geranyl-CoA Carboxylase Substrates

Die Geranylsäure **8**, welche kommerziell nur als *cis/trans*-Isomerengemisch erhältlich ist, wurde in dieser Arbeit zur Herstellung von Geranyl-CoA **19** als Substrat eingesetzt. Dadurch resultierte auch, dass das so bereitgestellte Substrat als Isomerengemisch vorlag. In den Arbeiten von Seubert wurde für die aus *P. citronellolis* aufgereinigte Geranyl-CoA Carboxylase festgestellt, dass diese lediglich das *cis*-Geranyl-CoA als Substrat akzeptiert (Seubert et *al.*, 1963). Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass das *trans*-Isomer einen Einfluss auf das Enzym, welches das *cis*-Isomer als Substrat verwendet, aufweist, sollten auch isomerenreine Substrate der Geranyl-CoA Carboxylase angeboten werden. Um diese weiterführenden Untersuchungen zur Aktivität der Carboxylase zu ermöglichen, war eine Trennung der Isomere erforderlich. Allerdings konnte die freie Säure **8** weder über Säulenchromatographie noch über Destillation getrennt werden. Um die Trennung zu ermöglichen, sollte die Säure daher zunächst zum Methylester **115** umgesetzt werden.

Die Darstellung des Geranylsäuremethylesters **115** konnte über eine Veresterung unter Steglich-Bedingungen erfolgreich erreicht werden, wobei dieser in einer Ausbeute von 98 % erhalten wurden. Eine sich anschließende Trennung der Doppelbindungsisomere über Destillation war zwar nicht erfolgreich, jedoch konnte dies später über semi-präparative HPLC erfolgen. Nach Trennung der gewünschten Produkte mittels HPLC wurde der *cis*-Geranylsäuremethylester **115a** mit einer Ausbeute von 26 % und der *trans*-Methylester **115b** mit einer Ausbeute von 67 % dargestellt.



Schema 4.59: Veresterung der Geranylsäure 8 unter Steglich-Bedingungen

Die so erhaltenen Geranylsäuremethylester **115a** und **115b** konnten einer Verseifung unterzogen werden, um die isomerenreinen Geranylsäuren **8a** und **8b** zu erhalten. Für eine solche Reaktion wurde die Arbeitsvorschrift nach Cantwell et *al*. (1978) leicht modifiziert und der entsprechende Ester in einer 2 N Natriumhydroxid-Lösung gelöst. Nach Erhitzen des

Reaktionsansatzes für 2 Stunden unter Rückfluss wurde die Reaktion aufgearbeitet. Sowohl die *cis*- als auch die *trans*-Geranylsäure konnte auf diesem Wege erfolgreich dargestellt werden. Die Säuren standen nach den jeweiligen Reaktionen mit einer Ausbeute von 93 % (*cis*, **8a**) bzw. 95 % (*trans*, **8b**) für die sich anschließende CoA-Ester Synthese zur Verfügung.



Schema 4.60: Verseifung der Geranylsäuremethylester 115a und 115b nach Cantwell et *al.*, 1978 (modifiziert)

Da die Synthese der CoA-Ester über die Methode des gemischten Anhydrids (Guan et *al.*, 1999; Förster-Fromme et *al.*, 2006) keine guten Ausbeuten liefert, sollte versucht werden eine direkte Umesterung des Geranylsäureesters **115** mit CoenzymA durchzuführen. Deshalb sollte die Darstellung eines Aktivesters erfolgen. Hierfür wurde Geranylsäure **8** unter analogen Bedingungen der bereits durchgeführten Steglich-Veresterung mit *p*-Chlorphenol **127** verestert. Nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie konnte das Produkt Geranylsäure-*p*-chlorphenylester **128** als Isomerengemisch mit einer Ausbeute von 80 % erhalten werden. An dieser Stelle gelang es jedoch nicht die Doppelbindungsisomere mittels semi-präparativer HPLC zu trennen, sodass auf eine direkte Umesterung mit CoenzymA verzichtet wurde. Eine Darstellung der entsprechenden isomerenreinen CoA-Ester der Geranylsäure war in diesem Falle somit nicht möglich.



Schema 4.61: Veresterung der Geranylsäure 8 mit *p*-Chlorphenol 127 unter Steglich-Bedingungen

Da auch eine direkte Veresterung der Geranylsäure **8** mit CoenzymA vorstellbar war, sollte dies mit einem CoA-Analogon **129** in einer Steglich-Veresterung getestet werden. An dieser Stelle konnte allerdings kein Umsatz beobachtet werden. Eine CoA-Ester Synthese über das gemischte Anhydrid konnte also im Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht umgangen werden.



Schema 4.62: Veresterung der Geranylsäure 8 mit einem CoA-Analogon 129 unter Steglich-Bedingungen

4.8.5.2. Darstellung der Vorstufe des Hydratase-Substrates

Die Darstellung der Vorstufe **117** des Hydratase-Substrates erfolgte zunächst nach Saito et *al.* (2000) unter Verwendung von Allylchlorformiat **116** und Geranylsäuremethylester **115** (Kap.4.8.4.). Um eine mögliche Erhöhung der Ausbeute zu erreichen, aber auch um einen entsprechenden Aktivester für weiterführende Reaktionen zur Verfügung zu stellen, sollte auch der Geranylsäure-*p*-chlorphenylester **128** als Edukt in diese Reaktion eingesetzt werden. Mit dem so dargestellten Aktivester **131** könnte dann eine direkte Veresterung mit CoenzymA getestet werden. Das gewünschte Produkt **131** konnte über diese Reaktion, welche unter analogen Reaktionsbedingungen, wie zuvor schon für den Geranylsäuremethylester **115** beschrieben, durchgeführt wurde, jedoch nicht erhalten werden.



Schema 4.63: Reaktion nach Saito et *al.* (2000) unter Verwendung des Geranylsäure-*p*-chlorphenolesters 128 und Allylchlorformiat 116

Wie bereits im Abschnitt 4.8.4 beschrieben, stellte die Reaktion mit Kohlenstoffdioxid den elegantesten Zugang zur Vorstufe des Hydratase-Substrates dar. Unter Verwendung der Vorschrift von Saito et *al.* (2000) konnte das Produkt **125** in einer Ausbeute von 93 % erhalten werden.

Für spätere Untersuchungen der Hydratase ist auch die Frage von Bedeutung, ob das Enzym beide Isomere (*cis* und *trans*) als Substrat verwenden kann, oder lediglich eines der beiden akzeptiert. Im folgenden Verlauf sollte daher auch bei der Vorstufe des Enzymsubstrates **125** eine Trennung der Doppelbindungsisomere erfolgen. Dies konnte an dieser Stelle mittels semi-präparativer HPLC erreicht werden, wobei das *cis*- und das *trans*-Isomer mit einer Ausbeute von 26 bzw. 69 % getrennt dargestellt werden konnten.



Schema 4.64: Darstellung der benötigten Vorstufe des Hydratase-Substrates 125 durch Carboxylierung der β-Methylgruppe des Geranylsäuremethylesters 115 in einer Reaktion nach Saito et *al.*, 2000

Eine Umsetzung dieser zu den entsprechenden CoA-Estern wäre somit möglich gewesen. Zur Darstellung des Hydratase-Substrates **20** wäre aber folgend auch die Verseifung der Esterfunktion erforderlich. Da die Thioesterbindung aber bei der Verseifung der Methylesterfunktion nicht stabil ist (Gan-Schreier et *al.*, 2005), wurde auf diese Umsetzung verzichtet. Eine Lösung des Problems läge in der Verwendung eines Geranylsäureesters mit einer leichter abspaltbaren Esterfunktion wie z.B. dem entsprechenden Benzyl- oder *tert*-Butylester. Im Rahmen dieser Arbeit war es allerdings nicht mehr möglich diese darzustellen und in die Carboxylierungsreaktion nach Saito et *al.* (2000) einzusetzen.

Da eine Entschützung des Methylesters nach Anbringen des CoA-Restes nicht mehr möglich ist, ohne den Thioester zu spalten, sollte nun der Methylester **125** zunächst verseift werden. Dies wurde nach einer leicht abgeänderten Vorschrift von Cantwell et *al.* (1978) unter basischen Bedingungen erreicht. Nach Aufarbeitung der Reaktion konnte das Produkt **94** als Isomerenmischung in einer Ausbeute von 91 % dargestellt werden.



Schema 4.65: Verseifung von 125 nach Cantwell et *al.* (1978, modifiziert) und Darstellung der freien Säure 94 für die CoA-Ester Synthese

Nach dem Erhalt der freien Dicarbonsäure **94** sollte getestet werden, ob durch die Steglich-Veresterung, aufgrund der verschiedenen elektronischen Eigenschaften der beiden Säuregruppen, selektiv nur eine Carboxylgruppe der Dicarbonsäure **94** verestert wird. Wäre es möglich, eine der beiden Säurefunktionen selektiv zu verestern, so könnte im späteren Verlauf der Arbeit direkt selektiv der CoA-Ester angeknüpft werden. Alternativ wären aber auch eine direkte Reaktion zu einem Aktivester oder zu den bereits zuvor angesprochenen Benzyl- bzw. *tert*-Butylestern denkbar. Der Aktivester könnte dabei in einer Umesterung mit CoenzymA getestet werden. Mit den Benzyl- bzw. *tert*-Butylester stünden dagegen Schutzgruppen zur Verfügung, welche nach einer erfolgreichen Reaktion mit CoenzymA über die Methode des gemischten Anhydrids (Guan et *al.*, 1999; Förster-Fromme et *al.*, 2006) ohne Veränderung der Thioesterbindung unter milden Reaktionsbedingungen abgespalten werden könnten.

Bei einer Veresterung der freien Dicarbonsäure 94 nach Steglich können theoretisch die drei im Schema 4.66 dargestellten Produkte 125a, 125b und 125c erhalten werden. In der durchgeführten Reaktion zeigte sich allerdings, dass eine Mischung aus den zwei einfach veresterten Isomeren (125a, 125b) generiert wurde. Das doppelt veresterte Produkt 125c konnte dagegen nicht eindeutig identifiziert werden. Auf diesem Wege war somit leider keine Differenzierung der beiden Säurefunktionen möglich.



Schema 4.66: Versuch zur selektiven Veresterung der Verbindung 94

Da nicht mehr genug Zeit für die praktischen Versuche zur Verfügung stand, musste das erhaltene Isomerengemisch der freien Dicarbonsäure 94 für die CoA-Synthese genutzt werden. Die Säure 94 wurde zur Synthese des entsprechenden CoA-Esters 20 über die Methode des gemischten Anhydrids (Guan et *al.* 1999; Förster-Fromme et *al.*, 2006, Kap.3.11) verwendet. Der so dargestellte CoA-Ester 20 (Isomerengemisch), stellte das Hydratase-Substrat dar und wurde in den entsprechenden Enzym-Assays eingesetzt.



Schema 4.67: Darstellung des Isohexenyl-glutaconyl-CoAs 20 nach Guan et *al.* (1999) unter Verwendung der Dicarbonsäure 94

Um die Verbindung **94** auch als isomerenreine Vorstufe des Hydratase-Substrates darstellen zu können, müsste in nachfolgenden Arbeiten, wie bereits zuvor beschrieben von einem anderen Geranylsäureester anstelle des Methylesters **115** ausgegangen werden. Nach Trennung der Doppelbindungsisomere und nach Anknüpfung des CoenzymAs an die freie Carboxylgruppe könnte dann die Verseifung der Esterfunktion erfolgen. Hierfür müssten also Esterfunktionen ausgewählt werden, welche unter milden Reaktionsbedingungen gespalten werden können, sodass die Thioesterbindung selbst somit nicht beeinflusst wird.

4.8.5.3. Darstellung der Vorstufe des Hydratase-Produktes/Lyase-Substrates

Für die Darstellung von möglichen Vorstufen des Hydratase-Produktes/Lyase-Substrates wurden verschiedene Wege in der vorliegenden Arbeit verfolgt. Nichtsdestotrotz war es letztendlich nicht möglich, diese über die Malonsäurediethylesterroute (Kap.4.8.1), die Acetonid-geschützte β -Ketosäureroute (Kap.4.8.2.) oder die Aceton-dicarbonsäure-diethylesterroute (Kap.4.8.3.) darzustellen. Während die Versuche zu diesen Synthesewegen

scheiterten, konnte in der Geranylsäureroute (Kap.4.8.4.) schließlich eine Vorstufe des Hydratase-Substrates **125** dargestellt werden. Allerdings war der Versuch die Vorstufen des Hydratase-Produktes/Lyase-Substrates **126** durch 1,4-Addition von Hydroxid-Ionen an die Verbindung **125** zu erhalten, nicht erfolgreich (Kap.4.8.4.). Weiterführende Versuche zur Darstellung der benötigten Verbindung waren aus Zeitgründen während dieser Arbeit nicht mehr möglich und müssen somit im Rahmen nachfolgender Arbeiten erfolgen.

4.8.5.4. Darstellung der Vorstufe des Lyase-Produktes

Die Darstellung der Vorstufe des Lyase-Produktes als mögliche Referenzverbindung war ausgehend von unterschiedlichen Ausgangsverbindungen theoretisch auf verschiedenen Wegen möglich. In den ersten beiden Syntheserouten (Malonsäurediethylesterroute und Acetonid-geschützte β -Ketosäureroute) konnten bereits mögliche Intermediate erhalten werden, von denen die weitere Synthese ausgehend erfolgen konnte.

In der Malonsäurediethylesterroute (Kap.4.8.1.) handelte es sich dabei um das alkylierten Oxazolin **40**. Um die gewünschte Verbindung bereitstellen zu können, war die Entschützung der Oxazolin-Spezies erforderlich. Hierzu sollte das Oxazolin-Derivat **40** mit HCl zur Säure **92** entschützt werden. Nach Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel konnte jedoch kein Produkt **92** erhalten werden. Daher sollte im folgenden Schritt das alkylierte Oxazolin **40** mit Methanol unter Zusatz von Acetylchlorid zum Ester **133** geöffnet und im Anschluss daran die Esterfunktion zum Erhalt der benötigten Verbindung **92** verseift werden. Allerdings konnte in der durchgeführten Reaktion auch der Ester **133** als Produkt der Entschützungsreaktion nicht erhalten werden.



Schema 4.68: Darstellung von Vorstufen des Lyase-Produktes ausgehend vom alkyliertem Oxazolin 40, welches in der Malonsäurediethylesterroute dargestellt wurde.

Da die Entschützung der Oxazolin-Verbindung **40** auf beiden Wegen scheiterte, konnte eine Vorstufe des Lyase-Produktes so nicht dargestellt werden.

Allerdings stand aus der Acetonid-geschützten β -Ketosäureroute (Kap.4.8.2.) der *tert*-Butylester **102** als Zwischenverbindung zur Verfügung. Um die β -Ketosäure **92** zu erhalten, wurde eine Vorschrift von Mehta et *al*. (1992) zur Entschützung mit Trifluoressigsäure (TFA) und Triethylsilan herangezogen. Die freie β -Ketosäure **92** konnte an dieser Stelle aber leider nicht erhalten werden.



Schema 4.69: Entschützung des tert-Butylesters 102 nach Mehta et al. (1992) zur Darstellung von 92

Da die vorangegangene Reaktion nicht erfolgreich war, wurde die Verseifung von **102** nach Cantwell et *al.* (1978) leicht modifiziert unter basischen Bedingungen mit Natriumhydroxid und Erhitzen unter Rückfluss durchgeführt. Nach Aufarbeitung der Reaktion musste jedoch festgestellt werden, dass das gewünschte Produkt **92** nicht erhalten werden konnte.



Schema 4.70: Verseifung des *tert*-Butylesters 102 nach Cantwell et *al.* (1978, modifiziert) zur Darstellung der freien Säure 92

Ein Grund für das Scheitern aller Versuche eine Entschützung des *tert*-Butylesters **102** zu erreichen, könnte darin liegen, dass β -Ketosäuren leicht decarboxylieren. Um dieses Problem zu umgehen, sollte eine direkte Umesterung mit Benzylmercaptan zum entsprechenden Aktivester **136** getestet werden. Sollte dies gelingen, so wäre es denkbar CoenzymA (CoA-SH) anstatt Benzylmercaptan einzusetzen und direkt 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA **23** zu erhalten. Ebenso könnte der erhaltene Aktivester **136** verwendet werden, um das 7-Methyl-3-oxo-6-octenoyl-CoA **23** durch eine direkte Umesterung mit CoenzymA darzustellen.

Für diese Reaktion sollte versucht werden, die β -Ketoester-Funktion durch Zusatz von Metallsalzen zu aktivieren. Die Verwendung von Kobalt (Cervello et *al.*, 1987a) bzw. von Kupfer (Cervello et *al.*, 1987b) zur Stabilisierung der Carbonylfunktion und die sofortige Umsetzung mit Benzylmercaptan für die Darstellung eines Aktivesters waren an dieser Stelle jedoch nicht erfolgreich.



Schema 4.71: Modifizierung der *tert*-Butylesterfunktion 102 durch Umesterung mit Benzylmercaptan unter Verwendung von [A] Cobaldacetat und [B] Kupferacetat zur Stabilisierung der Carbonylfunktion (Cervello et *al.*, 1987a, b)

Im Folgenden sollte eine "one-pot"-Entschützung mit direkt anschließender Veresterung mit Benzylmercaptan erfolgen. Hierzu wurde der *tert*-Butylester **102** unter milden Bedingungen mit Triethylsilan **137** und Trifluormethansulfonsäure **138** entschützt. Durch Zugabe von Benzylmercaptan **141**, als Testsubstrat bezogen auf CoenzymA, sollte dann das so entschützte Intermediat **140** direkt zum Thioester **136** weiterreagieren. Allerdings war es auch auf diesem Wege nicht möglich, den Thioester **136** zugänglich zu machen.



Schema 4.72: Umsetzung des *tert*-Butylesters 102 mit Trifluormethansulfonsäure 138 und Triethylsilan 137 und die sich anschließende Umesterung mit Benzylmercaptan 141

Einen anderen Ansatz stellte der Versuch dar, einen Aktivester mit Thiophenol herzustellen, welcher die direkte Synthese des entsprechenden CoA-Esters ermöglichen würde. Hierfür wurde zunächst nach der Vorschrift von Yaggi & Douglas (1977) verfahren. Zur Darstellung der benötigten Vorstufe **143** wurden Diketen **71** und Thiophenol **142** in absolutem DCM unter Zugabe von Triethylamin über Nacht gerührt. Nach Aufarbeitung der Reaktion und Aufreinigung mittels Säulenchromatographie an Kieselgel konnte der Aktivester **143** mit einer Ausbeute von 68 % erhalten werden.



Schema 4.73: Darstellung eines Aktivesters 143 aus Diketen 71 und Thiophenol 142 in absolutem DCM unter Zugabe von Triethylamin

Die Alkylierung des so dargestellten Thioesters 143 erfolgte anschließend in Anlehnung an die Vorschrift von Yang et *al.* (2002). Das Thiophenolderivat 143 wurde mit Hilfe von

Natriumhydrid und *n*-Butyllithium deprotoniert und an Isoprenylbromid **37** substituiert. Nach Aufarbeitung der Reaktion und Aufreinigung des Rohproduktes über Säulenchromatographie konnte das gewünschte Produkt **144** mit einer Ausbeute von 33 % dargestellt werden.



Schema 4.74: Alkylierung des Aktivesters 143 mit Isoprenylbromid 37

Zur anschließenden Umesterung mit dem CoA-Analogon **129** sollte das alkylierte Thiophenolderivat **144** mit Methyljodid bzw. mit Trimethyl-oxonium-tetrafluorborat ((Me₃O)BF₄) aktiviert werden. Hierfür wurden die beiden jeweiligen Komponenten in absolutem THF gelöst und bei RT für 3 Stunden gerührt, bevor die Zugabe des CoA-Analogons **129** erfolgte. Das gewünschte Produkt **146** konnte allerdings in beiden Reaktionen nicht festgestellt werden.



Schema 4.75: Versuch der Aktivierung der Thioesterbindung des Aktivesters 144 für die sich anschließende Umesterung mit einem CoenzymA-Analogon 129

Wie die Reaktionen zeigten, war es in dieser Arbeit letztendlich nicht möglich eine Synthese der freien Säure **92**, als Vorstufe für das Lyase-Produkt, bzw. des Lyase-Produktes **23** selbst erfolgreich durchzuführen.

Aufgrund früherer Arbeiten stehen der Arbeitsgruppe neben den Wildtypstämmen *P. aeruginosa* und *P. citronellolis* auch diverse Mutantenstämme zur Verfügung. Für eine mögliche Metabolit-Analyse dieser Stämme waren GC-Referenzen der jeweiligen Intermediate des Stoffwechselweges erforderlich. Somit sollte auch der Methylester **133** der Vorstufe des Lyase Produktes als GC-Referenz dargestellt werden.

Nach der Vorschrift von Yang et *al.* (2002) wurde dementsprechend Acetessigsäuremethylester **96** als Edukt mit Natriumhydrid und *n*-Butyllithium deprotoniert. Es folgte die Substitution an Isoprenylbromid **37**. Nach Aufarbeitung der Reaktion wurde das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt und das Methylester-Produkt **133** mit einer Ausbeute von 30 % erhalten.



Schema 4.76: Darstellung des Methylesters 133 als Vorstufe des Lyase Produktes 23 und als Referenzverbindung in Anlehnung an Yang et *al.*, 2002

4.8.6. Zusammenfassung

Im Verlauf der chemischen Arbeiten, sollten Wege gefunden werden, die jeweiligen direkten Vorstufen der Intermediate des *"lower atu pathways*" darzustellen (Abb. 4.94). Im Stoffwechsel von *P. aeruginosa* und *P. citronellolis* wird dabei auf Stufe der Hydratase ein chirales Zentrum (Abb. 4.94, Schritt 2) aufgebaut. Für das weitergehende Verständnis gegenüber diesem Stoffwechselweg lag unter Berücksichtigung dieser Tatsache auch bei den Versuchen der Synthese der Fokus auf dem selektiven Aufbau des Chiralitätszentrums. Ein weiterer Punkt, welche daraus resultierte, war die Klärung einer möglichen Enantio-differenzierung durch das im Stoffwechsel nachfolgende Enzym (3-Hydroxy-3-iso-hexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase, Abb. 4.94 Schritt 3). Neben der Synthese einer Vorstufe des Hydratase-Substrates wurde in der vorliegenden Arbeit die Trennung der resultierenden

Doppelbindungsisomere angestrebt, um diese auch einzeln als CoA-Substrat dem Hydratase-Enzym anbieten zu können. Weiterhin war es für noch ausstehende Versuche nötig, neben der Synthese auch eine Unterscheidung der aus dieser Reaktion resultierenden hydroxylierten Enantiomere zu ermöglichen, um zu untersuchen, welche Form als CoA-Substrat von der Lyase akzeptiert wird (Hydratase-Produkt/Lyase-Substrat).

In der vorliegenden Arbeit war es zunächst nicht möglich, das Isomerengemisch der Geranylsäure **8** zu trennen. Erst nachdem man diese in den Methylester **115** überführt hatte, konnte eine Trennung in das *cis-* und *trans-*Isomer (**115a** bzw. **115b**) mittels semipräparativer HPLC erfolgen. Während die beiden Methylester nun als GC-Referenz für spätere Metabolit-Analysen der Bakterienstämme zur Verfügung standen, konnten nach einer Verseifungsreaktion modifiziert nach Cantwell et *al.* (1978) auch die entsprechenden isomerenreinen Säuren **8a** und **8b** erhalten und in der CoA-Ester Synthese über das gemischte Anhydrid (Guan et *al.*, 1999; Förster-Fromme et *al.*, 2006) eingesetzt werden.

Während die Darstellung der benötigten Verbindungen über verschiedene Syntheserouten anfangs scheiterte, konnte der Geranylsäuremethylester 115 in einer Reaktion nach Saito et al. (2000) zur Vorstufe des Hydratase-Substrates 125 in einer Ausbeute von 93 % umgesetzt werden. Im Anschluss daran wurden beide Doppelbindungsisomere 125a und 125b über semi-präparative HPLC getrennt. Die durch Verseifung resultierende racemische Dicarbonsäure 94 konnte folgend aber nicht selektiv über eine Steglich-Reaktion verestert werden. Um die entsprechenden Isomere des CoA-Esters darzustellen, müsste in zukünftigen Arbeiten von anderen Geranylsäureestern wie z.B. Benzyl- oder. tert-Butylestern ausgegangen werden. Bei diesen wäre nach einer Reaktion mit dem CoenzymA auch eine Spaltung der Esterfunktion unter milden Reaktionsbedingungen ohne Spaltung des CoA-Thioesters denkbar. In der vorliegenden Arbeit konnte für die CoA-Ester Synthese somit lediglich das nach Verseifung erhaltene Isomerengemisch 94 verwendet werden, sodass eine mögliche stereospezifische Hydroxylierung durch das Enzym Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase nicht untersucht werden konnte. Nichtsdestotrotz auch hier standen die dargestellten Methylester (125a, 125b) als Referenz für nachfolgende Untersuchungen zur Verfügung.

Ausgehend von **125** wurde versucht, die sich anschließende Hydroxylierung im biologischen System (Abb. 4.94, Schritt 2) über eine 1,4-Addition mit Hydroxid-Ionen durchzuführen. Die Darstellung der Vorstufe des Hydratase-Produktes/Lyase-Substrates **126** verlief allerdings nicht erfolgreich. Im Rahmen dieser Arbeit waren weitergehende Versuche an dieser Stelle aus Zeitgründen nicht möglich, sodass diese in nachfolgenden Arbeiten erfolgen müssen.

Im Verlauf der Versuche der ersten beiden Syntheserouten (Weg A: Malonsäurediethylesterroute, Weg B: Acetonid-geschützte β-Ketosäureroute) wurden Zwischenverbindungen erhalten, welche zur Darstellung der Vorstufe des Lyase Produktes dienen konnten. Dabei handelte es sich zum einen um das alkylierte Oxazolin 40 und zum anderen um den tert-Butylester 102, wobei letzterer später auch über einen direkten Zugang bereitgestellt werden konnte. Doch obwohl diese Verbindungen in guten Ausbeuten dargestellt werden konnten, war weder die Entschützung der Oxazolin-Struktur 40 noch die Entschützung der tert-Butylfunktion von 102 in dieser Arbeit möglich. Auch der Versuch die Verseifung des tert-Butylesters 102 mit der Veresterung mit Benzylmercaptan 140 direkt zu verknüpfen scheiterte. Zum einen fungierte das Benzylmercaptan an dieser Stelle als Modellverbindung für das CoenzymA, wodurch eine direkte Veresterung der Vorstufe künftig auch mit diesem nicht möglich war. Zum anderen sollte über die Reaktion mit Benzylmercaptan auch ein Aktivester 136 generiert werden, um diesen im Anschluss mit CoenzymA direkt umzuestern. Da dieser allerdings nicht bereitgestellt werden konnte, war auch die direkte Umesterung hier nicht möglich. Über die Vorschrift von Yang et al. (2002) konnte jedoch der entsprechende Methylester 133 aus Acetessigsäuremethylester 96 und Isoprenylbromid 37 dargestellt werden und steht somit als Referenz für spätere Metabolit-Analysen ebenfalls zur Verfügung. Des Weiteren wurden in diese Arbeit Experimente zur Optimierung der CoA-Ester Synthese unternommen. Dabei war eine direkte Reaktion der Geranylsäure 8 mit einem CoA-Analogon **129** über eine Steglich Veresterung nicht möglich. Ebenfalls wurde versucht, Vorstufen von Intermediaten des Stoffwechsels in Aktivester zu überführen und diese mit Modellverbindungen umzuestern. Leider führten aber auch diese Versuche nicht zum gewünschten Ergebnis. Ein Umgehen der CoA-Ester Synthese über das gemischte Anhydrid durch eine direkte Veresterung bzw. über eine Umesterung eines Aktivesters mit CoenzymA war an diesem Punkt nicht möglich.



Abb. 4.94:Darstellung der Reaktionsabfolge des "lower atu pathways" und dem gegenüber gestellt die
Ergebnisse der chemischen Syntheseversuche
(1: Geranyl-CoA Carboxylase (AtuC/AtuF); 2: Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase (AtuE);
3: 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase (AtuA?))

4.9. Experimentelle Teil

4.9.1. Darstellung der Verbindungen der Malonsäurediethylesterroute

Synthese von 1-Brom-3-methyl-but-2-en 37 (Vani et al., 2001; Brückner et al., 2008)



In einem Reaktionsgefäß wurde 2-Methylbut-3-en-2-ol (86 g, 1 mol, 86,13 g/mol, d 0,820 g/ml) vorgelegt und auf 0 °C gekühlt. Unter kräftigem Rühren erfolgte das langsame Zutropfen einer wässrige HBr-Lösung (48 %ig, 400 ml, 3,5 mol, 3,5 eq.) in der Weise, dass die Innentemperatur nicht über 0-5 °C anstieg. Das Reaktionsgemisch wurde für 45 min bei 0 °C gerührt. Die erhaltene ölige Phase wurde abgetrennt und die wässrige Phase mit *n*-Pentan (2× 350 ml) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dann mit eiskalter, verdünnter Natriumhydrogencarbonat-Lösung (5 %, 100 ml) gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach Filtration wurde das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Eine Aufreinigung des Rückstandes erfolgte im Anschluss über fraktionierte Destillation unter vermindertem Druck (Sdp. bei 90 mbar 65-67 °C). Das Produkt wurde so als klare, farblose Flüssigkeit in einer Ausbeute von 67 % (100,16 g, 672 mmol) erhalten.

R_f 0,21 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.59-5.47 (m, 1*H*), 4.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 2*H*), 1.78 (s, 3*H*), 1.73 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 140.18, 120.78, 29.77, 25.80, 17.55.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2974 (m), 2933 (m), 2915 (m), 2858 (w), 1663 (m), 1448 (m), 1377 (m), 1226 (w), 1200 (s), 1104 (w), 1015 (m), 979 (w), 892 (w), 838 (s), 762 (m), 578 (m), 528 (w), 519 (w).

GC/MS (EI): *m/z* (%) = 148 (4), 133 (1), 119 (1), 107 (1), 81 (4), 69 (100), 67 (8), 65 (3), 61 (1), 53 (20).

Synthese von 2-(3-Methylbut-2-en-1-yl)-malonsäurediethylester 38a (Cocker et al., 1984)



Unter Stickstoffatmosphäre wurden in einem Reaktionsgefäß 15 ml Ethanol vorgelegt, Natrium (0,7 g, 30,4 mmol, 22,99 g/mol) unter Rühren gelöst, Malonsäurediethylester (4,8 g, 30 mmol, 160,17 g/mol) dem Ansatz zugesetzt und 2 Stunden bei RT gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde auf 0 °C gekühlt und Isoprenylbromid **37** (1-Brom-3-methyl-but-2en, 4,4 g, 29,5 mmol, 149,03 g/mol) gelöst in Ethanol (5 ml) dem Ansatz schnell zugetropft. Nach 6 Stunden Rühren bei RT wurde das Reaktionsgemisch für 30 min unter Rückfluss erhitzt. Der Ansatz kühlte auf RT ab und die Rektion wurde durch Zugabe von Ammoniumchlorid-Lösung hydrolisiert. Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase mit Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat getrocknet. Es folgte die Filtration und das Einengen des Rohproduktes am Rotationsverdampfer. Nach Aufreinigung über Säulenchromatographie an Kieselgel (20:1 PE/EA) konnten 5,83 g des Produktes als farblose, ölige Flüssigkeit (25,54 mmol, 85 %) isoliert werden.

R_f 0,49 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.12-5.02 (m, 1*H*), 4.19 (q, *J* = 7.1 Hz, 4*H*), 3.33 (t, *J* = 7.6 Hz, 1*H*), 2.59 (t, *J* = 7.4 Hz, 2*H*), 1.68 (s, 3*H*), 1.63 (s, 3*H*), 1.26 (t, *J* = 7.2 Hz, 6*H*). ¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 169.29, 134.83, 119.73, 61.28, 52.26, 27.57, 25.76, 17.77, 14.09.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2981 (w), 2936 (w), 1732 (s), 1447 (w), 1369 (m), 1332 (w), 1268 (m), 1239 (m), 1213 (m), 1148 (s), 1113 (w), 1097 (w), 1040 (m), 889 (w), 861 (w), 780 (w), 586 (w).

GC/MS (EI): *m*/*z* (%) = 228 (16), 183 (5), 160 (50), 154 (28), 139 (51), 115 (42), 109 (38), 95 (10), 81 (100), 69 (53), 55 (15).

Synthese von 2-(3-Methylbut-2-en-1-yl)-malonsäure **38b** (Cocker et *al.*, 1984, modifiziert)



In einem Reaktionsgefäß wurden 1,25 ml Wasser vorgelegt und darin 2 g NaOH gelöst. Da das Lösen an dieser Stelle nicht vollständig erfolgte, wurde zusätzliches Wasser dem Ansatz zugegeben, bis sich das gesamte Hydroxid gelöst hatte. Nach Abkühlen der Reaktionslösung wurde **38a** (1 g, 4,4 mmol, 228,29 g/mol) sowie eine Spatelspitze Tetrabutylammoniumchlorid, für einen besseren Phasenübergang, zugesetzt. Die so erhaltene weiße Lösung wurde über Nacht kräftig gerührt (16 Stunden). Nach Verdünnen des Ansatzes mit Wasser wurde dieser auf 0-5 °C gekühlt, mit konz. HCl-Lösung auf pH 2 angesäuert und mit Ethylacetat (dest.) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer weiter eingeengt. Die freie Dicarbonsäure **38b** als Produkt der Reaktion konnte als weißer Feststoff in einer Ausbeute von 74 % (558 mg, 3,2 mmol) erhalten werden.

Schmelzpunkt: 70 °C

R_f 0,08 (1:2 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 11.71 (s, 2*H*), 5.16-5.04 (m, 1*H*), 3.45 (t, *J* = 7.4 Hz, 1*H*), 2.65 (t, *J* = 7.4 Hz, 2*H*), 1.70 (s, 3*H*), 1.64 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 174.96, 135.99, 118.76, 51.84, 27.50, 25.77, 17.78.

IR (fest): ν (cm⁻¹) = 2971 (w), 2918 (w), 2567 (w), 2188 (w), 1962 (w), 1697 (s), 1416 (m), 1384 (w), 1254 (m), 1210 (m), 1156 (m), 1111 (w), 1063 (w), 1034 (w), 918 (m), 823 (w), 771 (w), 744 (w), 680 (m), 583 (w), 537 (w), 519 (w).

MS (EI, 70 eV): *m*/*z* (%) = 172 (63), 154 (8), 136 (13), 126 (79), 121 (1), 117 (5), 111 (100), 104 (11), 95 (7), 86 (15), 81 (98), 73 (7), 69 (88), 59 (19), 41 (61).

Synthese von 5-Methyl-hex-4-en-säure 39 (Cocker et al., 1984)



Die freie Dicarbonsäure **38b** (0,73 g, 5,7 mmol, 172,18 g/mol) wurde in Pyridin (1,6 ml) und Wasser (0,1 ml) für 2 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Die bräunlich trübe Reaktionsmischung wurde später zum Abtrennen des Pyridins am Rotationsverdampfer eingeengt, in Dichlormethan aufgenommen und erneut eingeengt. Diese Prozedur wurde drei weitere Male wiederholt. Noch enthaltende, restliche Spuren an Pyridin konnten durch Waschen des Rückstandes mit 2 N HCI-Lösung entfernt werden, sodass eine farblose Flüssigkeit als Produkt der Reaktion erhalten wurde. Die Ausbeute nach der Decarboxylierung betrug 92 % (674 mg, 5,3 mmol).

R_f 0,08 (1:2 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 11.47 (b, 1*H*), 5.15-5.01 (m, 1*H*), 2.45-2.25 (m, 4*H*), 1.69 (s, 3*H*), 1.62 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 180.11, 133.42, 122.04, 34.29, 25.67, 23.31, 17.65.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2970 (w), 2918 (m), 1707 (s), 1412 (m), 1378 (w), 1281 (m), 1223 (w), 935 (w), 827 (w), 548 (w).

MS (EI, 70 eV): *m*/*z* (%) = 128 (51), 111 (5), 95 (4), 82 (19), 69 (100), 59 (29), 56 (15), 41 (53).

Synthese von 5-Methyl-hex-4-en-säureethylester 53



Unter Schutzgasatmosphäre wurde in einem Reaktionsgefäß die Monocarbonsäure **39** (1,28 g, 10 mmol, 128,17 g/mol) in absolutem Dichlormethan (10 ml) gelöst und auf eine Temperatur von 0 °C gekühlt. Dann erfolgte die Zugabe von Ethanol (875 μ l, 15 mmol, 1,5 eq, 46,07 g/mol, d 0,79 g/ml) und 4-Dimethylaminopyridin (DMAP, 244,34 mg, 2 mmol, 0,2 eq, 122,17 g/mol). Dicyclohexylcarbodiimid (DCC, 2,48 g, 12 mmol, 1,2 eq, 206,33 g/mol)

wurde dem Ansatz nach 5 min portionsweise bei 0 °C zugegeben. Die Reaktionsmischung kam rührend über Nacht auf Raumtemperatur und wurde folgend über Celite/Kieselgel filtriert (DCM). Das so erhaltene Rohprodukt konnte im Anschluss über Säulenchromatographie (10:1 PE/Et₂O) gereinigt werden. Die Veresterung nach Steglich lieferte das gewünschte Produkt als farblose Flüssigkeit in einer Ausbeute von 93 % (1,45 g, 9,3 mmol).

R_f 0,59 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.15-5.04 (m, 1*H*), 4.13 (q, *J* = 7.1 Hz, 2*H*), 2.36-2.26 (m, 4*H*), 1.68 (s, 3*H*), 1.62 (s, 3*H*), 1.25 (t, *J* = 7.2 Hz, 3*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 173.49, 132.99, 122.48, 60.23, 34.55, 25.69, 23.68, 17.67, 14.26.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2979 (w), 2931 (w), 2858 (w), 2120 (m), 1737 (s), 1449 (w), 1374 (w), 1344 (w), 1252 (w), 1185 (w), 1150 (w), 1047 (w).

GC/MS (EI): *m*/*z* (%) = 156 (42), 127 (5), 111 (19), 101 (8), 95 (5), 88 (17), 82 (100), 73 (6), 69 (85), 60 (21), 55 (34).

Synthese von 1-(4,4-Dimethyl-4,5-dihydro-oxazol-2-yl)-6-methyl-hept-5-en-2-on **40** (Kuklev & Smith, 2006; Holzwarth, 2008)



Die Synthese des alkylierten Oxazolins **40** erfolgte zunächst unter Verwendung der Monocarbonsäure **39** (0,512 g, 4 mmol, 128,17 g/mol). Da die Reaktion unter Einsatz der Säure als Edukt das Produkt jedoch lediglich in einer Ausbeute von 24 % (0,21 g, 0,94 mmol) lieferte, wurde im Folgenden der entsprechende Säureethylester **53** als Edukt in die Reaktion eingesetzt.

Unter Stickstoffatmosphäre wurde 2,4,4-Trimethyl-2-oxazolin (0,77 ml, 6 mmol, 3 eq, 113,16 g/mol, d 0,887 g/ml) in Tetrahydrofuran (17 ml, dest.) gelöst und auf -78 °C gekühlt. Es wurde *n*-Butyllithium Lösung (4,13 ml, 6,6 mmol, 1,1 eq, 1,6 M in Hexan) der Mischung vorsichtig zugetropft und das Oxazolin über einen Zeitraum von 30 min deprotoniert. Der in THF (7 ml) gelöste Ethylester **53** (0,339 g, 2 mmol, 156,22 g/mol) wurde dem

Reaktionsansatz dann über eine Zeitspanne von 20 min vorsichtig zugetropft. Der Ansatz kam rührend über Nacht auf Raumtemperatur. Die gelbe, klare Lösung wurde durch Zugabe von demineralisiertem Wasser (ca. 10 ml) hydrolisiert. Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase mit Ethylacetat extrahiert und die vereinigten organischen Phasen mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Produkt ein zähflüssiges, gelbes Öl wurde über semi-präparativer HPLC (2:1 PE/EA) aufgereinigt und in einer Ausbeute von 70 % (313 mg, 1,4 mmol) erhalten.

R_f 0,39 (2:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 9.57 (b, 1*H*), 5.18-5.06 (m, 1*H*), 4.88 (s, 1*H*), 4.08 (s, 2*H*), 2.32-2.21 (m, 4*H*), 1.68 (s, 3*H*), 1.62 (s, 3*H*), 1.39 (s, 6*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 196.96, 168.44, 131.88, 123.87, 78.72, 76.22, 58.33, 41.89, 27.07, 25.71, 24.71, 17.67.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 3267 (w), 2974 (w), 2912 (w), 1623 (s), 1541 (s), 1488 (m), 1376 (m), 1310 (m), 1242 (w), 1205 (m), 1168 (m), 1120 (w), 1014 (s), 953 (m), 823 (w), 697 (m), 618 (m).

HRMS (ESI-HR): berechnet für C₁₃H₂₁NO₂, M + nH: 224,1645, gefunden: 224,1635. **MS** (EI, 70 eV): m/z (%) = 223 (38), 208 (5), 194 (1), 180 (1), 168 (1), 155 (30), 140 (58), 128 (2), 113 (100), 98 (12), 86 (5), 69 (16), 55 (8), 41 (11).

Synthese von (*E*/*Z*)-Ethyl-3-((4,4-dimethyl-4,5-dihydro-oxazol-2-yl)-methyl)-7-methyl-octa-2,6-dienoat **64** (Trost et *al.*, 1978)



Unter Stickstoffatmosphäre wurde Natriumhydrid (0,23 g, 5,8 mmol, 23,99 g/mol, 60 % in Mineralöl) in Dimethylformamid (DMF, 3 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt. Dann erfolgten die Zugabe von Diethyl-ethoxy-carbonylmethanphosphat (1,592 g, 7,1 mmol, 224,19 g/mol) und das Rühren der Reaktionsmischung für 30 min. Im Anschluss wurde dann das alkylierte Oxazolin **40** (0,223 g, 1 mmol, 223,31 g/mol) der Reaktion zugegeben und für weitere 30 min bei 0 °C und folgend über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Zur Aufarbeitung der Reaktion

wurde der Ansatz auf 0 °C gekühlt und mit demineralisiertem Wasser (10 ml) verdünnt. Nach Phasentrennung erfolgte dann die Extraktion der wässrigen Phase mit Diethylether (4× 10 ml). Die organischen Phasen wurden vereinigt, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung (10 ml) gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und im Anschluss filtriert. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer entfernt. Nach Aufreinigung der Probe mittels Säulenchromatographie (1:1 PE/EA) konnte das Produkt als gelbes Öl in einer Ausbeute von 4 % (11,74 mg, 0,04 mmol) erhalten werden.

R_f 0,73 (1:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.91 (s, 1*H*), 5.14-5.05 (m, 1*H*), 4.14 (q, *J* = 7.2 Hz, 2*H*), 3.96-3.89 (m, 2*H*), 2.28-2.10 (m, 4*H*), 1.68 (s, 3*H*), 1.63-1.54 (m, 5*H*), 1.28 (s, 6*H*), 1.26-1.18 (m, 3*H*).

¹³**C-NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.82, 161.22, 147.40, 132.54, 123.04, 115.79, 78.54, 66.60, 60.61, 38.82, 37.93, 29.71, 28.36, 26.03, 25.66, 17.70.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2970 (m), 2930 (m), 1734 (s), 1716 (s), 1665 (m), 1643 (m), 1601 (w), 1539 (w), 1461 (m), 1366 (m), 1305 (m), 1248 (m), 1157 (s), 1097 (m), 1032 (m), 997 (m), 865 (w), 820 (w), 743 (w), 619 (w), 552 (w).

HRMS (ESI-HR): berechnet für $C_{17}H_{27}NO_3$, M + nH: 294,2064, gefunden: 294,2063. **MS** (EI, 70 eV): m/z (%) = 293 (100), 264 (18), 248 (52), 238 (12), 220 (88), 206 (52), 196 (40), 180 (16), 164 (10), 153 (28), 138 (15), 123 (19), 113 (35), 100 (59), 86 (20), 69 (47)58 (40), 41 (32).

4.9.2. Darstellung der Verbindungen der Acetonid-geschützte β-Ketosäureroute

Synthese von 2,2,6-Trimethyl-4H-1,3-dioxin-4-on 41 (Carrol & Bader, 1953)



Für die Synthese wurden Aceton (dest., 3 ml), Diketen (γ -Methylenebutyrolacton, 3 ml, 39 mmol, 84,08 g/mol, d 1,09 g/ml) und *p*-Toluensulfonsäure (katalyt., 15 mg, 0,08 mmol, 190,22 g/mol) in einem Reaktionskolben unter Stickstoffatmosphäre zusammengegeben und unter Rückfluss für 3 Stunden erhitzt. Nach Abkühlen des Ansatzes erfolgte die Reinigung

der Reaktion durch Destillation unter Vakuum (60-70 °C, HV-Pumpenwagen $1,14 \times 10^{-2}$ mbar), wodurch das gewünschte Produkt als gelbliches Öl in einer Ausbeute von 27 % (1,49 g, 10,5 mmol) dargestellt werden konnte. Da das Diketen als Edukt zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr zur Verfügung stand, wurde **41** auch als kommerzielle Variante verwendet.

R_f 0,25 (5:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.25-5.23 (m, 1*H*), 1.99 (s, 3*H*), 1.69 (s, 6*H*). **IR** (Film): ν (cm⁻¹) = 3494 (br), 2978 (w), 2359 (w), 1735 (s), 1721 (s), 1638 (m), 1438 (w), 1392 (s), 1357 (s), 1273 (s), 1254 (m), 1205 (m), 1120 (w), 1031 (m), 1007 (m), 960 (w), 901 (w), 858 (w), 806 (w).

Synthese von 2,2-Dimethyl-6-(4-methylpent-3-en-1-yl)-4H-1,3-dioxin-4-on 42



Die Synthese der Verbindung **42** erfolgte im Verlauf der Arbeit auf zwei unterschiedlichen Wegen. Diese werden im Folgenden einzeln vorgestellt.

Unter Stickstoffatmosphäre wurde Diisopropylamin (1,05 ml, 7,5 mmol, 1,5 eq, 101 g/mol, d 0,72 g/ml) in absolutem THF (10 ml) gelöst und auf 0 °C gekühlt, bevor das vorsichtige Zutropfen einer *n*-Butyllithium Lösung (5,16 ml, 8,25 mmol, 1,1 eq, 1,6 M in Hexan) erfolgte. Der Ansatz wurde für 30 min bei 0 °C gerührt. Das Edukt **41** (0,71 g, 5 mmol, 142 g/mol) wurde in THF (10 ml) gelöst und langsam bei -78 °C zur Reaktionsmischung zugetropft. Es wurde 30 min bei dieser Temperatur gerührt. Der orangefarbenen, klaren Lösung wurde dann bei -78 °C Isoprenylbromid **37** (0,645 ml, 5,5 mmol, 149 g/mol, d 1,27 g/ml) gelöst in THF (5 ml) zugetropft und der Reaktionsansatz im Anschluss für weitere 16 Stunden gerührt, wobei dieser auf Raumtemperatur kam. Die Hydrolyse der Reaktionsmischung erfolgte durch die Zugabe gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung. Nach Phasentrennung wurde die wässrige Phase mit Diethylether extrahiert, die organischen Phasen vereinigt, mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen und über Natriumsulfat

getrocknet. Nach Filtration konnte das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt werden. Die Aufreinigung erfolgte durch säulenchromatographische Trennung an Kieselgel (15:1 PE/EA) und semi-präparativer HPLC (10:1 PE/EA). Das gewünschte Produkt konnte an dieser Stelle mit einer Ausbeute von 2 % (21,03 mg, 0,1 mmol) isoliert werden.

Eine weitere Möglichkeit das gewünschte Produkt 42 darzustellen bestand in der Verwendung der Arbeitsvorschrift von Graalfs et al. (1999). Hierfür erfolgte zunächst das Lösen von DMPU (3 ml) und Diisopropylamin (0,485 ml, 3,46 mmol, 101 g/mol, d 0,72 g/ml) in THF (20 ml) unter Stickstoffatmosphäre. Die Reaktionsmischung wurde auf -78 °C gekühlt und die *n*-Butyllithium Lösung (1,88 ml, 3 mmol, 1,6 M in Hexan) vorsichtig zugetropft. Nach 20 min rührend bei dieser Temperatur kam der Ansatz auf Raumtemperatur und wurde für weitere 10 min gerührt. Die so hergestellte LDA-Lösung wurde erneut auf -78 °C gekühlt und das Edukt 41 (0,298 g, 2,1 mmol, 142 g/mol) gelöst in 2 ml THF tropfenweise zugegeben. Nachdem die gelbe Lösung für weitere 30 min gerührt wurde, erfolgte die Zugabe von Isoprenylbromid 37 (0,70 ml, 6 mmol, 148 g/mol, d 1,27 g/ml) bei einer Temperatur von -78 °C. Der Lösung wurde erlaubt, langsam auf RT zu kommen. Nach 16 stündigem Rühren wurde die Reaktion durch Zugabe von 30 ml gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung hydrolisiert und die wässrige Phase mit Diethylether (3× 30 ml) extrahiert. Die gesammelten organischen Phasen wurden mit gesättigter Natriumchlorid-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Eine Aufreinigung der Probe erfolgte über Säulenchromatographie an Kieselgel (15:1 PE/EA) und lieferte das Produkt als gelbes Öl mit einer der Literatur entsprechenden Ausbeute von 18 % (79,48 mg, 0,38 mmol).

R_f 0,21 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.23 (s, 1*H*), 5.10-5.01 (m, 1*H*), 2.28-2.20 (m, 4*H*), 1.69 (s, 3*H*), 1.68 (s, 6*H*), 1.62 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 171.60, 161.37, 133.55, 121.80, 106.28, 93.37, 33.75, 25.63, 25.01, 24.31, 17.76.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2975 (w), 2929 (w), 2840 (w), 1726 (s), 1632 (m), 1443 (w), 1390 (s), 1375 (s), 1310 (w), 1270 (s), 1252 (m), 1203 (s), 1118 (w), 1041 (w), 1012 (m), 901 (m), 805 (m), 617 (w).

HRMS (ESI-HR): berechnet für C₁₂H₁₈O₃: 210,1256, gefunden: 210,1259.

MS (EI, 70 eV): *m*/*z* (%) = 210 (5), 152 (100), 137 (28), 124 (6), 111 (17), 97 (12), 91 (2), 84 (55), 69 (33), 59 (11), 41 (17).

Synthese von 7-Methyl-3-oxo-oct-6-enyl-säurebenzylester 91



In einem Mikrowellenvial wurden Benzylalkohol (dest., 1 ml, 10 mmol, 108,4 g/mol, d 1,05 g/ml) und Verbindung **42** (1,4 g, 5 mmol, 210 g/mol, 75 %) unter Stickstoffbegasung gemischt. Nach 1 Stunde bei 200 W und 115 °C in der Mikrowelle wurde die Reaktionsmischung über Säulenchromatographie an Kieselgel (10:1 PE/EA) aufgereinigt. Das Produkt konnte mit einer Ausbeute von 75 % als gelbe, ölige Flüssigkeit (0,979 g, 3,8 mmol) erhalten werden.

R_f 0,38 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.38-7.23 (m, 5*H*), 5.45-5.36 (m, 1*H*), 4.50 (s, 2*H*), 4.00 (d, J = 6.8 Hz, 2*H*), 1.76 (s, 3*H*), 1.66 (s, 3*H*), 1.65-1.49 (m, 4*H*).

¹³**C-NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 192.56, 167.06, 133.31, 130.16, 129.69, 128.59, 128.47, 127.04, 76.33, 66.40, 65.40, 29.75, 26.50, 24.50.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2970 (w), 2915 (w), 2857 (w), 2363 (w), 1793 (w), 1736 (w), 1604 (w), 1496 (w), 1452 (m), 1377 (m), 1362 (w), 1203 (w), 1105 (m), 1068 (s), 1028 (m), 941 (w), 831 (w), 734 (s), 696 (s), 614 (w).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 176 (9) [M-C₆H₁₁], 161 (10), 142 (1), 132 (9), 120 (1), 107 (8), 98 (1), 91 (100), 85 (22), 77 (6), 70 (13), 65 (8), 57 (15), 41 (15).

Synthese von (*E*/*Z*)-1-Ethyl 5-methyl 3-methyl-pent-2-endioat 97 (Machleidt et *al.*, 1963)



Zur Darstellung der benötigten Ylid-Lösung wurde Triphenylphosphin (1,31 g, 5 mmol, 262,28 g/mol) unter Stickstoffatmosphäre in absolutem DMF (5 ml) gelöst. Unter Rühren erfolgte dann die vorsichtige Zugabe des Bromessigsäureethylesters (0,55 ml, 5 mmol, 167,01 g/mol, d 1,51 g/ml). Nach achtstündigem Stehenlassen der Reaktionslösung bei RT wurde die so erhaltene Ylidlösung mit Natriummethanolat (297 mg, 5,5 mmol, 1,1 eq, 54,02 g/mol) versetzt und für 20 min bei RT gerührt. Nach anschließender Zugabe von destilliertem Acetessigsäuremethylester (0,54 ml, 5 mmol, 1 eq, 116,1 g/mol, d 1,08 g/ml) erfolgte das Erwärmen des Ansatzes für 9 Stunden auf 90 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von demineralisiertem Wasser (20 ml) und etwas Petrolether (2 ml) beendet. Der entstandene Feststoff (Triphenylphosphinoxid) wurde abfiltriert und mit PE gewaschen. Nach Phasentrennung des Durchflusses wurde die wässrige Phase mit PE extrahiert, die vereinigten organischen Phasen mit demineralisiertem Wasser gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Die Probe wurde mittels Vakuum eingeengt und über Säulenchromatographie an Kieselgel (10:1 PE/EA) und semi-präparativer HPLC (10:1 PE/EA) gereinigt. Die Reaktion lieferte 110 mg eines gelblichen Öls als Produkt (0,6 mmol, 12 %).

Die Verbindung liegt als Mischung der E/Z Isomere vor.

R_f 0,50 (5:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.88-5.83 (m, 0,5*H*), 5.80-5.76 (m, 0,5*H*), 4.17 (q, J = 7.1 Hz, 2*H*), 3.74 (s, 1*H*), 3.70 (s, 1.5*H*), 3.69 (s, 1.5*H*), 3.14 (s, 1*H*), 2.24 (d, J = 1.5 Hz, 1.5*H*), 1.98 (d, J = 1.5 Hz, 1.5*H*), 1.27 (t, J = 7.2 Hz, 1.5*H*), 1.26 (t, J = 7.2 Hz, 1.5*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.25, 169.87, 166.56, 166.49, 151.41, 151.22, 119.09, 118.75, 61.07, 60.82, 51.06, 51.03, 45.97, 38.51, 25.70, 18.90, 14.21, 14.1.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2984 (w), 2952 (w), 1716 (s), 1654 (m), 1436 (w), 1367 (w), 1321 (m), 1257 (m), 1223 (m), 1143 (s), 1097 (w), 1037 (m), 949 (w), 917 (w), 858 (w).

GC/MS (EI): *m*/*z* (%) = 154 (43) [M-OCH₃], 140 (87), 126 (35), 112 (100), 108 (19), 98 (88), 82 (31), 71 (12), 67 (11), 59 (27), 53 (40).

Synthese von 1-Ethyl-5-methyl 3-hydroxy-3-methyl-pentandioat **98** (Le Mignot et *al.*, 1998; Schmidt, 2008)



Zink (0,64, 10 mmol, 63,9 g/mol) wurde in absolutem Dioxan (10 ml) unter Stickstoffatmosphäre suspendiert. Tri-*n*-butylphosphin (2,5 ml, 10 mmol, 202,32 g/mol, d 0,81 g/ml) und Bromessigsäureethylester (1,11, 10 mmol, 167,01 g/mol, d 1,51 g/ml) wurden dem Ansatz zugegeben. Acetessigsäuremethylester (0,54 ml, 5 mmol, 116,1 g/mol, d 1,08 g/ml) gelöst in absolutem Dioxan (10 ml) wurde zugesetzt und die Reaktionsmischung über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes wurde das Zink abfiltriert und das Filtrat unter Vakuum eingeengt. Die Reinigung des Rückstandes erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (7:1 PE/EA) und semi-präparativer HPLC (10:1 PE/EA), wobei ein gelbliches Öl erhalten wurde. Das Produkt der Reaktion konnte so in einer Ausbeute von 48 % (0,49 g, 2,4 mmol) dargestellt werden. Als Nebenreaktion konnte eine Umesterung beobachtet werden, welche das entsprechende Nebenprodukt **99** mit einer Ausbeute von 9 % (0,1 g, 0,5 mmol) lieferte.

Hauptprodukt: 1-Ethyl-5-methyl 3-hydroxy-3-methyl-pentandioat 98



Die Verbindung liegt als Mischung aus Keto- und Enol-Form vor.

R_f 0,50 (5:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.88-5.84 (m, 0,5*H*), 5.80-5.76 (m, 0,5*H*), 4.17 (q, J = 7.1 Hz, 2*H*), 3.74 (s, 1*H*), 3.70 (s, 1.5*H*), 3.69 (s, 1.5*H*), 3.14 (d, J = 0.9 Hz, 1*H*), 2.24 (d, J = 1.3 Hz, 1.5*H*), 1.98 (d, J = 1.4 Hz, 1.5*H*), 1.27 (t, J = 7.2 Hz, 3*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.00, 169.61, 166.30, 166.24, 151.15, 150.96, 118.83, 118.49, 60.81, 60.56, 50.80, 50.78, 45.71, 38.25, 25.45, 18.65, 13.91, 13.88.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2985 (w), 2953 (w), 1715 (s), 1654 (m), 1436 (w), 1366 (w), 1321 (m), 1257 (m), 1223 (m), 1143 (s), 1097 (w), 1037 (m), 948 (w), 917 (w), 859 (w).

GC/MS (EI): *m*/*z* (%) = 154 (41) [M-OCH₃-H₂O], 140 (86), 126 (35), 112 (100), 108 (19), 98 (91), 86 (1), 82 (31), 71 (13), 67 (10), 59 (30), 53 (47).

Nebenprodukt: Diethyl-3-hydroxy-3-methyl-pentandioat 99



99

Die Verbindung liegt als Mischung aus Keto- und Enol-Form vor.

R_f 0,56 (5:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.87-5.83 (m, 0,5*H*), 5.79-5.75 (m, 0,5*H*), 4.22-4.09 (m, 4*H*), 3.74 (s, 1*H*), 3.13 (d, *J* = 0.9 Hz, 1*H*), 2.23 (d, *J* = 1.3 Hz, 1.5*H*), 1.97 (d, *J* = 1.4 Hz, 1.5*H*), 1.32-1.21 (m, 6*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 170.05, 169.68, 165.90, 165.82, 150.73, 150.50, 119.30, 118.97, 60.79, 60.53, 59.55, 59.53, 45.72, 38.24, 25.43, 18.60, 14.00, 13.97, 13.90, 13.88.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2982 (w), 2939 (w), 1735 (m), 1712 (s), 1653 (m), 1446 (w), 1416 (w), 1368 (w), 1353 (w), 1320 (w), 1257 (m), 1221 (m), 1141 (s), 1096 (m), 1052 (m), 1037 (m), 929 (w), 859 (w), 832 (w).

GC/MS (EI): *m*/*z* (%) = 154 (80) [M-H₂O], 127 (59), 109 (10), 98 (100), 82 (29), 71 (11), 66 (1), 60 (1), 53 (21).

Synthese von 7-Methyl-3-oxo-oct-6-en-säure-tert-butylester 102



Die Darstellung des *tert*-Butylesters **102** erfolgte zunächst über eine Mikrowellenreaktion. Hierfür wurden die Verbindung **42** (0,105 g, 0,5 mmol, 210,27 g/mol) und *tert*-Butanol (0,095 ml, 1 mmol, 74,12 g/mol, d 0,78 g/ml), sowie ggf. die entsprechende Lewis-Säure (LiCl, ZnCl₂, 0,1 mmol) unter Stickstoffatmosphäre in einem Mikrowellenvial gemischt. Nach 15 min bei 200 W und 90 °C in der Mikrowelle wurde der Reaktionsansatz über Säulenchromatographie an Kieselgel (10:1 PE/EA) aufgereinigt. Das Produkt konnte in einer Ausbeute von 12 % (14 mg, 0,06 mmol) als gelbliche Flüssigkeit erhalten werden. Der Versuch, durch Erhöhung der Reaktionszeit auf 60 min in der Mikrowelle eine deutlich bessere Ausbeute zu erreichen, schlug fehl. Diese Reaktion unter veränderten Bedingungen lieferte eine Ausbeute von 19 % (21 mg, 0,09 mmol).

Eine andere Möglichkeit stellte die Verwendung der Arbeitsvorschrift von Yang et *al.* (2002) dar. Nach dieser Vorschrift erfolgte zunächst die Herstellung einer Suspension aus Natriumhydrid (0,66 g, 16,5 mmol, 23,99 g/mol, 1,1 eq, 60 % in Mineralöl) in absolutem THF (100 ml), zu welcher im Anschluss unter Stickstoffatmosphäre *tert*-Butylacetoacetat (2,5 ml, 15 mmol, 158,2 g/mol, 1,0 eq, d 0,968 g/ml) langsam bei einer Temperatur von 0 °C zugetropft wurde. Nach 15 min erfolgte die Zugabe von *n*-Butyllithium (10,3 ml, 16,5 mmol, 1,1 eq, 1,6 M in Hexan). Isoprenylbromid **37** (2,24 g, 15 mmol, 149,04 g/mol, d 1,27 g/ml) wurde tropfenweise 1 Stunde später bei der gleichen Temperatur zugesetzt. Die Reaktion wurde bei Raumtemperatur über Nacht gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels wurde der Rückstand in demineralisiertem Wasser gelöst und mit Diethylether extrahiert. Die organischen Extrakte wurden mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Produkt der Reaktion eine gelblich, ölige Flüssigkeit wurde über Säulenchromatographie an Kieselgel (10:1 PE/EA) aufgereinigt und in einer Ausbeute von 70 % (2,38 g, 10,5 mmol) erhalten.

R_f 0,46 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.12-4.99 (m, 1*H*), 3.34 (s, 2*H*), 2.55 (t, *J* = 7.4 Hz, 2*H*), 2.33-2.22 (m, 2*H*), 1.68 (s, 3*H*), 1.62 (s, 3*H*), 1.47 (s, 9*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 203.04, 166.45, 132.93, 122.36, 81.82, 50.69, 42.90, 27.94, 25.62, 22.20, 17.61.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2977 (w), 2930 (w), 1735 (m), 1713 (s), 1643 (w), 1454 (w), 1409 (w), 1394 (w), 1368 (m), 1315 (m), 1250 (m), 1145 (s), 1078 (m), 1036 (w), 985 (w), 949 (w), 840 (m), 751 (w), 587 (w).

HRMS (ESI-HR): berechnet für C₁₃H₂₂O₃, 266,1569, gefunden: 226,1578.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 226 (4), 184 (1), 171 (12), 170 (100), 155 (4), 153 (36), 152 (25), 137 (2), 127 (7), 115 (13), 110 (44), 102 (15), 93 (30), 82 (13), 70 (3), 69 (51), 57 (63), 43 (8), 41 (20), 29 (5).
Aktivierung von Zinkpulver (Newman & Evans Jr., 1955; Nakamura, 2002)

$$Zn \xrightarrow{HCI} Zn^*$$

Für eine Reformatsky-Reaktion wurde zunächst die Aktivierung des Zinks erforderlich. Zink (10 g) wurde daher 3-mal mit 2 N HCl (12 ml) suspendiert und intensiv gerührt. Des Weiteren erfolgte das Waschen des so behandelten Zinks mit demineralisiertem Wasser (3×12 ml), Aceton (2×8 ml) und Diethylether (2×8 ml). Das jeweilige Lösungsmittel wurde durch Dekantieren wieder entfernt. Das aktivierte Zink wurde unter Vakuum über Nacht getrocknet. Weiterhin wurde Zink im Verlauf der Arbeit zum Rieke Zink aktiviert und in die entsprechende Reaktion eingesetzt (Boudjouk et *al.*, 1986; Nakamura, 2002).

Synthese von 1-*tert*-Butyl-5-ethyl 3-hydroxy-3-(4-methyl-pent-3-en-1-yl)-pentandioat **104**, unter Aktivierung von Zink zum Rieke Zink (Boudjouk et *al.*, 1986; Nakamura, 2002)



Unter Stickstoffatmosphäre wurde Zinkchlorid (1,64 g, 12 mmol, 136,3 g/mol) zunächst in einem Reaktionsgefäß getrocknet (100 °C, Vakuum, Pumpenwagen, 5,19 × 10^{-2} mbar) und dann in absolutem THF (10 ml) gelöst. Im Anschluss daran erfolgte die Zugabe von Lithium (0,556 g, 24 mmol, 6,95 g/mol, 30 % in Mineralöl). Die Reaktionsmischung wurde unter Stickstoffatmosphäre für 1 Stunde mit Ultraschall behandelt (Aktivierung des Zinks zum Rieke Zink). Das Lösungsmittel wurde im Anschluss unter Vakuum entfernt, die feine graue Suspension mit Diethylether (10 ml) verdünnt und der Ansatz auf 0 °C gekühlt, bevor die Zugabe von 10 % Bromessigsäureethylester (0,11 ml von Σ 1,1 ml, 10 mmol, 167,01 g/mol, d 1,51 g/ml) erfolgte. Die restlichen 90 % Bromessigsäureethylester (0,99 ml) wurden mit dem *tert*-Butylester **102** (1,81 g, 8 mmol, 226,31 g/mol) gemischt und gemeinsam der Reaktionsmischung zugesetzt. Dem Reaktionsansatz wurde erlaubt auf RT zu kommen und weiter über Nacht gerührt. Der Reaktionsmischung wurde zur Aufarbeitung kalte gesättigte zunächst die Extraktion der wässrigen Phase mit Diethylether, bevor die organischen Phasen

vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet wurden. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (40:1 PE/EA) gereinigt. Das noch verunreinigte Produkt konnte mit einer Ausbeute von 6 % (18 mg, 0,06 mmol) erhalten werden. Aufgrund der zu geringen Menge war es jedoch nicht möglich eine weitere Reinigung über semi-präparativer HPLC durchzuführen, sodass die Probe lediglich mittels ¹H-NMR und GC-MS analysiert werden konnte. Produktfragmente konnten dabei in der GC-MS Analyse gefunden werden und auch die NMR Analyse ließ das gewünschte Produkt in der Probe vermuten. Durch das Fehlen der restlichen Analytik war es aber trotz dieser Ergebnisse nicht möglich, das gewünschte Produkt eindeutig zu bestätigen. Aufgrund der sehr geringen Ausbeute, war es in dieser Arbeit nicht sinnvoll, diese Reaktion weiter zu verfolgen.

R_f 0,34 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

GC/MS (EI): *m*/*z* (%) = 256 (10) [M-*t*Bu], 238 (10), 220 (6), 210 (11), 193 (23), 182 (6), 164 (21), 151 (10), 142 (12), 128 (9), 121 (3), 111 (33), 95 (13), 82 (18), 69 (72), 57 (100).

Synthese von 1-*tert*-Butyl-5-ethyl 3-hydroxy-3-(4-methyl-pent-3-en-1-yl)-pentandioat **104** (Schmidt, 2008)



104

Zink (0,128 g, 2 mmol, 2 eq, 63,9 g/mol) wurde in absolutem Dioxan (2 ml) unter Stickstoffatmosphäre suspendiert. Tri-*n*-butylphosphin (0,5 ml, 2 mmol, 2 eq, 202,32 g/mol, d 0,81 g/ml) und Bromessigsäureethylester (0,222 ml, 2 mmol, 2 eq., 167,01 g/mol, d 1,51 g/ml) wurden dann dem Ansatz zugegeben. Der *tert*-Butylester **102** (0,226 g, 1 mmol, 1 eq, 226,13 g/mol) gelöst in absolutem Dioxan (2 ml) wurde zugesetzt und die Reaktionsmischung für 18 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen des Reaktionsansatzes wurde das Zink abfiltriert, gewaschen und das Filtrat unter Vakuum eingeengt. Die Reinigung des Rückstandes erfolgte mittels Säulenchromatographie an Kieselgel (10:1 PE/EA), wobei eine gelblich, ölige Flüssigkeit erhalten wurde. Statt des gewünschten Produktes **104** konnten

allerdings lediglich Signale erhalten werden, welche für die Verbindung des Ethylesters **110** (23 %, 46 mg, 0,23 mmol) und somit für den Ablauf einer Retro-Reformatsky-Reaktion sprachen.

7-methyl-3-oxo-oct-6-en-säureethylester 110



R_f 0,37 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.13-4.99 (m, 1*H*), 4.19 (q, *J* = 7.2 Hz, 2*H*), 3.43 (s, 2*H*), 2.57 (t, *J* = 7.4 Hz, 2*H*), 2.33-2.00 (m, 2*H*), 1.68 (s, 3*H*), 1.62 (s, 3*H*), 1.28 (t, *J* = 7.2 Hz, 3*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 202.63, 167.23, 133.12, 122.27, 61.35, 49.41, 43.05, 25.67, 22.24, 17.66, 14.12.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2978 (w), 2917 (w), 1743 (s), 1716 (s), 1647 (w), 1603 (w), 1446 (w), 1410 (m), 1368 (m), 1312 (m), 1235 (m), 1178 (m), 1097 (m), 1079 (m), 1039 (m), 938 (w), 840 (w), 740 (w), 652 (w), 583 (w).

GC/MS (EI): *m*/*z* (%) = 126 (15) [M-CO₂Et], 111 (48), 108 (94), 97 (2), 93 (31), 83 (21), 77 (10), 69 (83), 65 (11), 62 (2), 58 (4), 55 (100), 51 (14).

Synthese von *tert*-Butyl-3-((4,4-dimethyl-4,5-dihydro-oxazol-2-yl)-methyl)-3-hydroxy-7methyl-oct-6-enoat **112** (Meyers et *al.*, 1974)



2,4,4-Trimethyl-2-oxazolin (513 μ l, 4 mmol, 113,16 g/mol, d 0,887 g/ml) wurde unter Stickstoffatmosphäre in absolutem THF (5 ml) gelöst und die Mischung auf -78 °C gekühlt. Es folgte die Zugabe von *n*-Butyllithium Lösung (3,13 ml, 5 mmol, 1,6 M in Hexan) und das Rühren des Ansatzes bei -78 °C für 30 min. Anschließend wurde der *tert*-Butylester **102** (1,13 g, 5 mmol, 226,31 g/mol) der Reaktionsmischung zugesetzt. Die Reaktion kam langsam auf RT und wurde weitere 16 Stunden gerührt. Zur Aufarbeitung wurde das Reaktionsgemisch in Eiswasser gegeben und mit 2 N HCl neutralisiert. Dann wurde das Reaktionsgemisch mit Diethylether (1×) extrahiert. Die wässrige Phase wurde mit 2,5 N Natriumhydroxid-Lösung neutralisiert und nochmals mit Diethylether (3×) extrahiert. Die gereinigten Ether-Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie an Kieselgel aufgereinigt (10:1 PE/EA) und 246 mg Produkt als gelbliches Öl (0,72 mmol, 15 %) erhalten.

R_f 0,35 (5:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.12 (b, 1*H*), 4.89 (b, 1*H*), 3.91 (d, *J* = 1.9 Hz, 2*H*), 2.67-2.46 (m, 4*H*), 2.17-2.06 (m, 2*H*), 1.68 (s, 3*H*), 1.61 (s, 3*H*), 1.46 (s, 9*H*), 1.27 (d, *J* = 1.5 Hz, 6*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 171.13, 163.89, 131.73, 124.06, 80.96, 78.58, 71.68, 67.08, 44.17, 39.60, 36.94, 28.38, 28.32, 28.08, 25.69, 22.19, 17.66.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 3378 (br), 2970 (m), 2928 (m), 2361 (w), 1723 (m), 1660 (m), 1439 (m), 1390 (m), 1366 (s), 1250 (m), 1148 (s), 1078 (m), 988 (m), 955 (m), 917 (w), 884 (w), 840 (w), 778 (w), 609 (w) 575 (w).

HRMS (ESI-HR): berechnet für C₁₉H₃₃NO₄, M + nNa: 362,2302, gefunden: 362,2304. **MS** (EI, 70 eV): m/z (%) = 339 (25), 324 (1), 296 (1), 283 (3), 267 (6), 266 (36), 256 (5), 240 (2), 225 (14), 224 (100), 202 (4), 201 (31), 200 (70), 182 (5), 171 (6), 157 (15), 156 (48), 140 (9), 115 (2), 114 (16), 113 (54), 98 (7), 82 (2), 69 (7), 57 (9), 55 (3).

4.9.3. Darstellung der Verbindungen der Geranylsäureroute

Synthese von 3,7-Dimethyl-2,6-octadiensäure-methylester (Geranylsäuremethylester) 115



115

Die Darstellung des Geranylsäuremethylesters **115** erfolgte über die Veresterung unter Steglich-Bedingungen. Geranylsäure **8** (5,26 ml, 30 mmol, 1 eq, 168,24 g/mol, d 0,96 g/ml) wurde für diese Reaktion unter Stickstoffatmosphäre in absolutem DCM (60 ml) gelöst. Nach

Kühlen des Ansatzes auf 0 °C erfolgte die Zugabe von Methanol (1,83 ml, 45 mmol, 1,5 eq, 32,04 g/mol, d 0,79 g/ml) und DMAP (36,7 mg, 0,3 mmol, 122,17 g/mol). Nach 5 min wurde DCC (6,81 g, 33 mmol, 206,33 g/mol) Portionsweise dem Reaktionsansatz zugesetzt. Die Reaktion kam auf RT und wurde für weitere 16 Stunden gerührt. Das Reaktionsgemisch wurde über eine Flash-Säule mit Kieselgel und Celite filtriert (DCM), am Rotationsverdampfer aufkonzentriert und im Anschluss über semi-präparativer HPLC (40:1 PE/Et₂O) gereinigt. Der Methylester **115** wurde in einer Ausbeute von 98 % (5,36 g, 29,4 mmol) erhalten. Die Trennung der Doppelbindungsisomere erfolgte über HPLC, wobei das *cis*-Isomer **115a** in einer Ausbeute von 26 % (1,42 g, 7,8 mmol) und das *trans*-Isomer **115b** in einer Ausbeute von 67 % (3,66 g, 20 mmol) dargestellt werden konnte.

cis-Geranylsäuremethylester 115a

R_f 0,57 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.66 (s, 1*H*), 5.18-5.13 (m, 1*H*), 3.68 (s, 3*H*), 2.64 (t, J = 7.9 Hz, 2*H*), 2.21-2.11 (m, 2*H*), 1.89 (s, 3*H*), 1.68 (s, 3*H*), 1.62 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 166.76, 160.57, 132.21, 123.66, 115.79, 50.78, 33.49, 26.80, 25.68, 25.36, 17.63.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2969 (w), 2917 (w), 2858 (w), 1966 (w), 1718 (s), 1647 (m), 1435 (m), 1376 (m), 1322 (w), 1276 (w), 1241 (m), 1212 (m), 1190 (m), 1155 (s), 1106 (w), 1063 (m), 1022 (m), 919 (m), 852 (m), 822 (w), 735 (w), 590 (w).

GC/MS (EI): *m*/*z* (%) = 182 (4), 167 (1), 151 (6), 139 (8), 123 (22), 114 (50), 107 (8), 99 (5), 91 (7), 83 (33), 77 (6), 69 (100), 59 (6), 53 (14).

trans-Geranylsäuremethylester 115b

 $\mathbf{R_f}$ 0,56 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.67 (s, 1*H*), 5.10-5.04 (m, 1*H*), 3.69 (s, 3*H*), 2.18-2.13 (m, 7*H*), 1.69 (s, 3*H*), 1.61 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 167.30, 160.20, 132.55, 122.96, 115.18, 50.81, 40.94, 26.04, 25.68, 18.83, 17.70.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2917 (w), 2857 (w), 2370 (w), 1966 (w), 1718 (s), 1649 (m), 1424 (m), 1382 (w), 1357 (w), 1325 (w), 1279 (w), 1220 (s), 1143 (s), 1108 (w), 1060 (w), 1028 (w), 984 (w), 921 (w), 864 (w), 819 (w), 732 (w), 589 (w), 526 (w).

GC/MS (EI): *m*/*z* (%) = 182 (2), 167 (1), 151 (8), 139 (7), 123 (20), 114 (36), 107 (6), 99 (4), 91 (4), 83 (21), 77 (4), 69 (100), 59 (5), 53 (14).

Synthese von 3,7-Dimethyl-2,6-octadiensäure-4-chlorphenylester (Geranylsäureparachlorphenylester) **128**



128

Für die Darstellung des Geranylsäureparachlorphenylesters **128** wurde unter Stickstoffatmosphäre Geranylsäure **8** (2,05 ml, 11,67 mmol, 168,24 g/mol, d 0,96 g/ml) in absolutem DCM (10 ml) gelöst und auf eine Temperatur von 0 °C gekühlt, bevor die Zugabe von DMAP (79 mg, 0,65 mmol, 122,17 g/mol) erfolgte. Das Parachlorphenol (1,29 g, 10 mmol, 128,56 g/mol) wurde dem Ansatz anschließend Portionsweise zugesetzt. Nach 5 min unter Rühren erfolgte dann die Zugabe von DCC (2,06 g, 10 mmol, 206,33 g/mol). Die Reaktionsmischung kam auf RT und wurde für weitere 16 Stunden gerührt. Der Niederschlag wurde mittels Säulenfiltration (Kieselgel/Celite, DCM) entfernt, das Eluent am Rotationverdampfer eingeengt und das Rohprodukt mittels Säulenchromatographie (60:1 PE/EA) aufgereinigt. Das Produkt als farblose, ölige Flüssigkeit konnte mit einer Ausbeute von 80 % (2,6 g, 9,3 mmol) erhalten werden. Für die Analytik war es später möglich die beiden Isomere mittels semi-präparativer HPLC (100:1 PE/Et₂O) zu trennen, wobei die Ausbeuten in diesem Falle jedoch nicht bestimmt wurden.

cis-Geranylsäureparachlorphenylester 128a

R_f 0,68 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.36-7.30 (m, 2*H*), 7.08-7.01 (m, 2*H*), 5.87 (s, 1*H*), 5.17-5.10 (m, 1*H*), 2.71-2.64 (m, 2*H*), 2.23-2.14 (m, 2*H*), 1.99 (s, 3*H*), 1.67 (s, 3*H*), 1.61 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 164.41, 164.13, 149.22, 132.42, 130.79, 129.34, 123.39, 123.18, 114.94, 33.80, 26.73, 25.73, 25.69, 17.65.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2970 (w), 2915 (w), 2858 (w), 1735 (m), 1641 (m), 1591 (w), 1486 (s), 1440 (w), 1404 (w), 1376 (w), 1321 (w), 1292 (w), 1201 (s), 1162 (m), 1119 (s), 1085 (s), 1051 (m), 1013 (m), 982 (w), 951 (m), 931 (m), 844 (m), 761 (w), 692 (w), 662 (w), 584 (w), 528 (w), 506 (m).

HRMS (ESI-HR): berechnet für $C_{16}H_{19}ClO_2$, M + nNa: 301,0966, gefunden: 301,0963. **MS** (EI, 70 eV): m/z (%) = 278 (1), 263 (1), 236 (1), 221 (1), 208 (1), 192 (1), 183 (1), 167 (1), 151 (100), 123 (10), 109 (11), 95 (3), 82 (8), 69 (37), 59 (3), 41 (11).

trans-Geranylsäureparachlorphenylester 128b

 $\mathbf{R_f}$ 0,66 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.36-7.30 (m, 2*H*), 7.09-7.02 (m, 2*H*), 5.88 (s, 1*H*), 5.13-5.08 (m, 1*H*), 2.28-2.23 (m, 4*H*), 2.22 (s, 3*H*), 1.71 (s, 3*H*), 1.63 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 164.71, 164.05, 149.23, 132.82, 130.81, 129.35, 123.19, 122.75, 114.33, 41.21, 26.03, 25.69, 19.23, 17.74.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2969 (w), 2916 (w), 2857 (w), 1736 (m), 1642 (m), 1591 (w), 1486 (s), 1440 (w), 1404 (w), 1384 (w), 1357 (w), 1324 (w), 1199 (s), 1161 (m), 1116 (s), 1083 (s), 1050 (m), 1013 (m), 986 (m), 954 (m), 932 (m), 854 (m), 833 (m), 749 (w), 692 (w), 665 (w), 577 (w), 490 (w).

HRMS (ESI-HR): berechnet für C₁₆H₁₉ClO₂: 278,1074, gefunden: 278,1076 und 280,1050. **MS** (EI, 70 eV): m/z (%) = 278 (5), 167 (1), 151 (100), 123 (10), 107 (2), 82 (8), 69 (93), 53 (2), 41 (14).

Synthese von 3,7-Dimethyl-2,6-octadiensäure (Geranylsäure) 8



Für die Darstellung der beiden Doppelbindungsisomere der Geranylsäure **8a** und **8b** wurden die durch semi-präparativer HPLC getrennten *cis*- und *trans*-Geranylsäuremethylester (**115a** bzw. **115b**) unter basischen Bedingungen verseift (modifiziert nach Cantwell et *al.*, 1978). Der jeweilige Methylester (182 mg, 1 mmol, 182,26 g/mol) wurde in 5 ml 2 N NaOH-Lösung gelöst und folgend für 2 Stunden unter Rückfluss erhitzt. Zur Aufarbeitung der Ansätze

erfolgte das Verdünnen mit demineralisiertem Wasser und das Extrakhieren mit Diethylether $(2\times)$. Die wässrige Phase wurde im Anschluß mit 2 N HCl-Lösung angesäuert und mit Ethylacetat $(3\times)$ extrahiert. Die resultierenden organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Die jeweilige Reaktion lieferte als Produkt 156,5 mg (93 %, 0,93 mmol, **8a**) der *cis*- bzw. 159,8 mg (95 %, 0,95 mmol, **8b**) der *trans*-Geranylsäure als gelbe, ölige Flüssigkeit.

cis-Geranylsäure 8a

R_f 0,24 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 10.92 (b, 1*H*), 5.68 (s, 1*H*), 5.14 (t, *J* =7.3 Hz, 1*H*), 2.66-2.59 (m, 2*H*), 2.19-2.11 (m, 2*H*), 1.93 (s, 3*H*), 1.69 (s, 3*H*), 1.62 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 171.96, 163.70, 132.44, 123.52, 115.76, 33.75, 26.87, 25.76, 25.70, 17.56.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2971 (w), 2917 (w), 1687 (s), 1636 (s), 1441 (m), 1413 (m), 1377 (w), 1289 (m), 1257 (s), 1224 (m), 1181 (m), 1106 (w), 1081 (w), 1058 (w), 1014 (w), 984 (w), 931 (w), 857 (m), 824 (w).

MS (EI, 70 eV): *m*/*z* (%) = 168 (24), 153 (2), 135 (1), 123 (15), 111 (6), 100 (34), 91 (2), 82 (10), 69 (100), 60 (2), 53 (3), 41 (19).

trans-Geranylsäure 8b

R_f 0,23 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 10.73 (b, 1*H*), 5.69 (s, 1*H*), 5.15-5.00 (m, 1*H*), 2.38-2.02 (m, 4*H*), 2.17 (s, 3*H*), 1.69 (s, 3*H*), 1.61 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 172.47, 163.06, 132.67, 122.82, 115.28, 41.24, 26.02, 25.66, 19.16, 17.69.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2969 (w), 2917 (w), 1687 (s), 1637 (s), 1420 (m), 1376 (w), 1293 (m), 1247 (s), 1171 (m), 1108 (w), 1056 (w), 932 (w), 894 (w), 868 (m), 821 (w).

MS (EI, 70 eV): *m*/*z* (%) = 168 (20), 153 (2), 140 (1), 123 (21), 108 (4), 100 (29), 91 (2), 82 (6), 69 (100), 53 (3), 41 (16).

Synthese von (E/Z)-5-Allyl-1-methyl-3-(4-methyl-pent-3-en-1-yl)-pent-2-endioat **117** (Saito et *al.*, 2000)



Für die Darstellung der ATPH-Lösung, wurde 2,6-Diphenylphenol (1,22 g, 4,95 mmol, 246,31 g/mol) in absolutem Toluol (5 ml) unter Stickstoffatmosphäre gelöst. Bei RT erfolgte dann die Zugabe von Trimethylaluminium (Me₃Al, 0,83 ml, 1,65 mmol, 2 M in Toluol). Die Reaktionsmischung wurde bei RT für 30 min gerührt, wobei eine Gas- (CH₄) und Wärmeentwicklung festgestellt werden konnte. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurde für die Synthese der benötigten LTMP-Lösung destilliertes 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (194 µl, 1,1 mmol, 141,25 g/mol, d 0,83 g/ml) in absolutem THF (5 ml) unter Stickstoffatmosphäre gelöst und die Mischung auf -78 °C gekühlt. Erst dann erfolgte die Zugabe von *n*-Butyllithium (0,72 ml, 1,1 mmol, 1,6 M in Hexan) und das Rühren des Ansatzes für 30 min bei dieser Temperatur. Die ATPH-Lösung wurde nach entsprechender Reaktionszeit auf -78 °C gekühlt, bevor dem Ansatz der Geranylsäuremethylester 115 (182 mg, 1 mmol, 182,26 g/mol) und anschließend das Allylchlorformiat (53 µl, 0,5 mmol, 120,53 g/mol, d 1,13 g/ml) vorsichtig zugesetzt wurde. Nach 5 min erfolgte dann das Zutropfen der LTMP-Lösung bei -78 °C über einen Zeitraum von 2-3 min und das Rühren der Reaktionsmischung für 30 min. Der Ansatz wurde durch Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung hydrolisiert, über Celite filtriert (Et₂O) und das Filtrat mit Diethylether extrahiert ($3\times$). Die gesammelten organischen Phasen wurden vereinigt und über Natriumsulfat getrocknet, das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt. Das Produkt wurde nach Säulenchromatographie an Kieselgel (20:1 PE/EA) in einer Ausbeute von 15 % (20 mg, 0,08 mmol) erhalten.

R_f 0,37 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (500 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 6.01-5.86 (m, 1*H*), 5.89 (s, 1*H*), 5.37-5.20 (m, 2*H*), 5.13-5.03 (m, 1*H*), 4.63-4.58 (m, 2*H*), 3.73 (s, 2*H*), 3.69 (s, 3*H*), 2.31-2.23 (m, 2*H*), 2.22-2.12 (m, 2*H*), 1.69 (s, 3*H*), 1.61 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 169.77, 164.84, 153.85, 131.86, 131.31, 121.59, 117.21, 117.12, 63.66, 50.97, 38.10, 36.26, 24.71, 24.65, 16.71.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 3383 (br), 2973 (m), 2919 (m), 2364 (w), 1729 (s), 1649 (w), 1447 (m), 1377 (m), 1247 (s), 1165 (m), 1140 (s), 1100 (s), 1055 (s), 1003 (s), 930 (m), 889 (w), 801 (w), 703 (w), 669 (w), 656 (w), 649 (w), 642 (w).

HRMS (ESI-HR): berechnet für $C_{15}H_{22}O_4$, M+ nNa: 289,1410, gefunden: 289,1381. **MS** (EI, 70 eV): m/z (%) = 289 (100) [$C_{15}H_{22}O_4$, M+ nNa], 219 (15), 207 (2), 191 (2), 177 (4), 167 (1), 149 (4), 135 (1), 125 (1), 109 (6).

Synthese von (E/Z)-Methyl-3-(2-hydroxy-2-phenylethyl)-7-methyl-octa-2,6-dienoat 119



119

Zur Darstellung der Verbindung wurde die bereits zuvor beschrieben Reaktion nach Saito et *al.* (2000) mit Benzaldehyd anstelle des Allylchlorformiats angesetzt.

Ansatz:

a)	a) ATPH-Lösung: 2,6-Diphenylphenol (1,22 g, 4,95 mmol, 3 eq, 2	
		in absolutem Toluol (5 ml)
		Me ₃ Al (0,83 ml, 1,65 mmol, 1 eq, 2 M in Toluol)
b)	LTMP-Lösung:	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (dest., 194 µl, 1,1 mmol,
		141,25 g/mol, d 0,83 g/ml) in absolutem THF (5 ml)
		<i>n</i> -Butyllithium (0,72 ml, 1,1 mmol, 1,6 M in Hexan)
Reaktionszeit:		a) 30 min, RT
		b) 45 min, -78 °C

Nach der entsprechenden Reaktionszeit erfolgte das Kühlen der ATPH-Lösung (Ansatz a) auf -78 °C und die Zugabe des Geranylsäuremethylesters **115** (182 mg, 1 mmol, 182,26 g/mol) sowie des Benzaldehyds (51 µl, 0,5 mmol, 106,12 g/mol, d 1,05 g/ml). Nach weiteren 5 min wurde die LTMP-Lösung (Ansatz b) vorsichtig zur gekühlten ATPH-Lösung (Ansatz a) zugegeben und der Reaktionsansatz für weitere 30 min bei -78 °C und folgend über Nacht gerührt. Die Aufarbeitung der Reaktion erfolgte wie bereits zuvor beschrieben (siehe vgl.

Verbindung **117**, S. 262). Die Reinigung des Rohproduktes über Säulenchromatographie an Kieselgel (10:1 PE/EA) und semi-präparativer HPLC (8:1 PE/EA) lieferte 30,7 mg einer gelblichen Flüssigkeit als Produkt der Reaktion (0,11 mmol, 21 %).

 $\mathbf{R_f}$ 0,18 (8:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.40-7.25 (m, 5*H*), 5.77 (s, 1*H*), 5.20-5.11 (m, 1*H*), 4.91-4.84 (dd, J = 7.7 Hz, 5.5 Hz, 1*H*), 3.69 (s, 3*H*), 2.91-2.79 (dt, J = 12.1 Hz, 7.9 Hz, 1*H*), 2.61-2.44 (m, 3*H*), 2.28-2.09 (m, 2*H*), 1.68 (s, 3*H*), 1.62 (s, 3*H*). ¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 166.47, 159.86, 143.74, 132.51, 128.63, 127.88, 125.71, 123.50, 118.12, 72.31, 50.98, 48.32, 32.22, 27.13, 25.70, 17.69. **IR** (Film): ν (cm⁻¹) = 3450 (br), 2916 (w), 1716 (m), 1695 (m), 1641 (m), 1494 (w), 1450 (m), 1434 (m), 1376 (m), 1291 (w), 1236 (m), 1209 (m), 1158 (s), 1082 (w), 1051 (m), 1026 (m), 913 (w), 860 (w), 832 (w), 756 (m), 699 (s), 549 (w). **GC/MS** (EI): m/z (%) = 288 (1), 270 (2), 227 (5), 211 (9), 203 (5), 195 (6), 181 (12), 167 (16), 151 (8), 143 (33), 135 (6), 122 (17), 107 (80), 99 (3), 91 (21), 79 (97), 69 (100), 53 (20).

Synthese von (*E*/*Z*)-Methyl-3-(2-hydroxyethyl)-7-methyl-octa-2,6-dienoat 122



122

Zur Darstellung dieser Verbindung wurde die bereits zuvor beschrieben Reaktion nach Saito et *al.* (2000) mit Formaldehyd bzw. Paraformaldehyd anstelle des Allylchlorformiats angesetzt. Der gasförmige Formaldehyd wurde dabei durch thermische Zersetzung aus Paraformaldehyd bereitgestellt und in die Reaktion an entsprechender Stelle eingeleitet.

Ansatz:

b) LTMP-Lösung: 2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (dest., 194 μl, 1,1 mmol, 141,25 g/mol, d 0,83 g/ml) in absolutem THF (5 ml)
n-Butyllithium (0,72 ml, 1,1 mmol, 1,6 M in Hexan)

Reaktionszeit:

a) 30 min, RT b) 45 min, -78 °C

Nach der angegebenen Reaktionszeit erfolgte das Kühlen der ATPH-Lösung (Ansatz a) auf -78 °C und folgend die Zugabe von Geranylsäuremethylester **115** (182 mg, 1 mmol, 182,26 g/mol) und Paraformaldehyd (Spatelspitze) bzw. Formaldehyd. Nach weiteren 5 min wurde die LTPH-Lösung (Ansatz b) langsam zur ATPH-Lösung (Ansatz a) zugegeben und der Ansatz für weitere 30 min bei -78 °C und folgend bei RT für 16 Stunden gerührt.

Zur Aufarbeitung der Reaktion erfolgte die Zugabe von gesättigter Ammoniumchlorid-Lösung. Weiterhin wurde nun gekühlte 2 N Schwefelsäure der Reaktionsmischung vorsichtig zugetropft, bis sich der gebildete Niederschlag fast löste. Nach Phasentrennung erfolgte dann die Extraktion der wässrigen Phase mit Diethylether, das Trocknen der vereinigten organischen Phasen über Natriumsulfat und das Einengen der Probe am Rotationsverdampfer. Nach Säulenchromatographie an Kieselgel (5:1 PE/EA) konnte bei Einsatz von Paraformaldehyd das Produkt in einer Ausbeute von 26 % (55,2 mg, 0,26 mmol) als gelbliches Öl erhalten werden. Die Reaktion unter Verwendung von Formaldehyd als Edukt, welches durch Erhitzen des Paraformaldeyds hergestellt und in die Reaktion eingeleitet wurde, lieferte lediglich 12,7 mg an Produkt (6 %, 0,06 mmol).

Die Verbindung liegt als Mischung der *E*/*Z* Isomere vor.

 $\mathbf{R_f}$ 0,47 (3:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.84-5.79 (m, 0.5*H*), 5.72 (s, 0.5*H*), 5.20-5.11 (m, 0.5*H*), 5.11-5.00 (m, 0.5*H*), 4.37 (t, *J* = 6.2 Hz, 1*H*), 3.85-3.74 (m, 2*H*), 3.71 (s, 1.5*H*), 3.69 (s, 1.5 *H*), 2.84 (t, *J* = 6.2 Hz, 1*H*), 2.64 (t, *J* = 7.9 Hz, 1*H*), 2.33-2.10 (m, 4*H*), 1.69 (s, 3*H*), 1.62 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 168.30, 166.48, 160.80, 160.16, 133.34, 132.79, 132.45, 123.47, 122.75, 122.19, 117.29, 117.12, 61.48, 60.41, 51.33, 50.94, 41.39, 38.42, 35.57, 32.19, 28.00, 27.14, 25.67, 25.02.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 3418 (br), 2917 (w), 1715 (s), 1641 (m), 1435 (m), 1376 (m), 1268 (m), 1211 (m), 1159 (s), 1106 (w), 1082 (m), 1044 (s), 923 (w), 864 (m), 733 (w), 669 (w), 577 (w), 557 (w).

GC/MS (EI): *m*/*z* (%) = 212 (1), 194 (1), 180 (8), 169 (2), 152 (9), 144 (7), 135 (7), 126 (37), 119 (7), 112 (17), 107 (11), 96 (6), 91 (13), 79 (11), 69 (100), 59 (9), 53 (17).

HRMS (ESI-HR): berechnet für $C_{12}H_{20}O_3$, M + nNa: 235,1305, gefunden: 235,1304.

Synthese von (E/Z)-5-tert-Butyl-1-methyl-(4-methyl-pent-3-en-1-yl)-pent-2-endioat 124



124

Die Darstellung der Verbindung erfolgte nach einer Vorschrift von Saito et al. (2000).

Ansatz:

a)	ATPH-Lösung:	2,6-Diphenylphenol (1,22 g, 4,95 mmol, 3 eq, 246,31 g/mol)	
		in absolutem Toluol (5 ml)	
		Me ₃ Al (0,83 ml, 1,65 mmol, 1 eq, 2 M in Toluol)	
b)	LTMP-Lösung:	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (dest., 194 µl, 1,1 mmol,	
		141,25 g/mol, d 0,83 g/ml) in absolutem THF (5 ml)	
		<i>n</i> -Butyllithium (0,72 ml, 1,1 mmol, 1,6 M in Hexan)	
Reaktionszeit:		a) 30 min, RT	
		b) 45 min, -78 °C	

Nach der oben aufgeführten Reaktionszeit wurde die ATPH-Lösung (Ansatz a) auf eine Temperatur von -78 °C gekühlt, bevor die Zugabe von Geranylsäuremethylester **115** (182 mg, 1 mmol, 182,26 g/mol) und Di-tert-butyl-di-carbonat (Boc Anhydrid, 109 mg, 0,5 mmol, 218,25 g/mol) erfolgte. Nach weiteren 5 min unter Rühren wurde die LTMP-Lösung (Ansatz b) langsam zur ATPH-Lösung (Ansatz a) zugegeben und die Reaktionsmischung bei -78 °C für 90 min bzw. bei RT über Nacht gerührt. Nach Aufarbeitung der Reaktion, wie zuvor beschrieben (siehe Verbindung **122**, S. 265), wurde zur Reinigung eine Säulenchromatographie an Kieselgel (40:1 PE/EA) durchgeführt. Das Produkt konnte lediglich in Spuren identifiziert werden. Eine weitere Reinigung über semi-präparativer HPLC und damit die Isolierung und vollständige Charakterisierung war jedoch an dieser Stelle aufgrund der zu geringen Menge (8,2 mg, Ausbeute unter 5 %) nicht möglich.

 $\mathbf{R}_{\mathbf{f}}$ 0,44 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

Synthese von (*E*/*Z*)-3-(2-Methoxy-2-oxoethyliden)-7-methyl-oct-6-en-säure 125



125

Die Darstellung dieser Verbindung erfolgte nach der Vorschrift von Saito et *al.* (2000) mit Kohlenstoffdioxid, unter Veränderung der Versuchsdurchführung.

Ansatz:

a)	ATPH-Lösung:	2,6-Diphenylphenol (1,22 g, 4,95 mmol, 3 eq, 246,31 g/mol)	
		in absolutem Toluol (5 ml)	
		Me ₃ Al (0,83 ml, 1,65 mmol, 1 eq, 2 M in Toluol)	
b)	LTMP-Lösung:	2,2,6,6-Tetramethylpiperidin (dest., 194 µl, 1,1 mmol,	
		141,25 g/mol, d 0,83 g/ml) in absolutem THF (5 ml)	
		<i>n</i> -Butyllithium (0,72 ml, 1,1 mmol, 1,6 M in Hexan)	
Reaktionszeit:		a) 30 min, RT	
		b) 35 min, -78 °C	

Nachdem die Reaktionszeit erreicht wurde, erfolgte das Kühlen der ATPH-Lösung (Ansatz a) auf eine Temperatur von -78 °C und die Zugabe des Geranylsäuremethylesters **115** (182 mg, 1 mmol, 182,26 g/mol). Der Ansatz wurde für 5 min gerührt und folgend auch die LTMP-Lösung (Ansatz b) langsam zugesetzt. Erst dann erfolgte das Einleiten des zuvor getrockneten, gasförmigen Kohlenstoffdioxids (15-30 min) in die Reaktionslösung. Die Reaktion wurde für weitere 30 min bei -78 °C und bei RT über Nacht gerührt. Für die 266

Aufarbeitung der Reaktion wurde dem Ansatz gesättigte Ammoniumchlorid-Lösung zugesetzt. Weiterhin erfolgte die vorsichtige Zugabe von gekühlter 2 N Schwefelsäure zum Ansäuern der Reaktion. Nach Phasentrennung erfolgte die Extraktion der wässrigen Phase mit Ethylacetat (3×). Die vereinigten organischen Phasen wurden im Anschluss daran eingeengt und zweimal mit gesättigter Natriumcarbonat-Lösung ausgeschüttelt. Die Säure-Ion enthaltene wässrige Phase wurde dann zweimal mit Diethylether gewaschen, folgend durch Zugabe von 2 N HCl angesäuert und wiederum mit Ethylacetat extrahiert (3×). Die so erhaltenen organischen Phasen wurden vereinigt, getrocknet und unter Vakuum eingeengt. Das Produkt konnte so ohne weitere Aufreinigung mit einer Ausbeute von 93 % (0,21 g, 0,93 mmol) erhalten werden. Die Trennung der Doppelbindungsisomere erfolgte über semi-präparativer HPLC (5:1 PE/EA). Dabei konnte eine Ausbeute von 69 % (156 mg, 0,69 mmol, **125a**) bzw. 26 % (59 mg, 0,26 mmol, **125b**) erreicht werden.

cis-3-(2-Methoxy-2-oxoethyliden)-7-methyl-oct-6-en-säure 125a

$\mathbf{R_f}$ 0,29 (2:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 9.53 (b, 1*H*), 5.88 (s, 1*H*), 5.11-5.02 (m, 1*H*), 3.73 (s, 3*H*), 3.66 (s, 2*H*), 2.33-2.24 (m, 2*H*), 2.23-2.11 (m, 2*H*), 1.68 (s, 3*H*), 1.60 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 174.35, 167.76, 155.08, 132.99, 122.47, 118.11, 51.54, 39.26, 38.59, 25.65, 25.62, 17.73.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2951 (w), 2916 (w), 1710 (s), 1650 (m), 1435 (m), 1414 (m), 1375 (m), 1320 (m), 1245 (m), 1193 (s), 1161 (s), 1132 (s), 1107 (m), 1046 (m), 1025 (m), 919 (w), 861 (m), 826 (w), 732 (w), 693 (w), 597 (w).

HRMS (ESI-HR): berechnet für $C_{12}H_{18}O_4$, M + nNa: 249,1097, gefunden: 249,1099. **MS** (ESI): m/z (%) = 249 (100) [$C_{12}H_{18}O_4$, M + nNa], 227 (8), 209 (2), 195 (10), 181 (2), 167 (17), 149 (3), 135 (3), 121 (4), 107 (7).

trans-3-(2-Methoxy-2-oxoethyliden)-7-methyl-oct-6-en-säure 125b

R_f 0,19 (2:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 9.98 (b, 1*H*), 5.80 (s, 1*H*), 5.18-5.08 (m, 1*H*), 3.70 (s, 3*H*), 3.18 (s, 2*H*), 2.77-2.63 (m, 2*H*), 2.28-2.08 (m, 2*H*), 1.68 (s, 3*H*), 1.61 (s, 3*H*). ¹³**C-NMR** (125 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 176.04, 166.24, 154.57, 132.75, 123.16, 119.62,

51.14, 43.47, 32.17, 26.74, 25.65, 17.63.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2917 (w), 2371 (w), 1971 (w), 1715 (s), 1647 (m), 1554 (w), 1435 (m), 1376 (m), 1238 (m), 1208 (s), 1157 (s), 1043 (m), 1022 (m), 854 (m), 826 (m), 771 (w), 738 (w), 593 (w).

HRMS (ESI-HR): berechnet für $C_{12}H_{18}O_4$, M + nNa: 249,1097, gefunden: 249,1096. **MS** (ESI): m/z (%) = 249 (100) [$C_{12}H_{18}O_4$, M + nNa], 225 (2), 209 (2), 195 (4), 186 (2), 167 (13), 147 (2), 121 (3), 107 (6).

Synthese von (E/Z)-3-(4-Methyl-pent-3-en-1-yl)-pent-2-en-disäure 94



Für die Darstellung der freien Säure **94** wurde die Verbindung **125** unter basischen Bedingungen nach einer etwas modifizierten Vorschrift von Cantwell et *al.* (1978) verseift. Hierfür wurde die Verbindung **125** (0,226 g, 1 mmol, 226,27 g/mol) in 5 ml 2 N NaOH-Lösung gelöst und unter Rückfluss für 2 Stunden erhitzt. Zur Aufarbeitung des Reaktionsansatzes wurde dieser zunächst mit demineralisiertem Wasser verdünnt, bevor eine Diethyletherextraktion (2×) erfolgte. Die wässrige Phase wurde mit 2 N HCl angesäuert und mit Ethylacetat (3×) extrahiert. Die so erhaltenen organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum eingeengt. Nach dieser Aufarbeitung konnte das Produkt der Reaktion als Isomerenmischung in einer Ausbeute von 91 % (193 mg, 0,91 mmol) dargestellt werden.

Die Verbindung liegt als Mischung der E/Z Isomere vor.

Schmelzpunkt: 72°C

R_f 0,08 und 0,10 (1:2 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (250 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 9.71 (b, 2*H*), 5.83 (s, 0.5*H*), 5.77 (s, 0.5*H*), 5.12-4.93 (m, 1*H*), 3.63 (s, 1*H*), 3.15 (s, 1*H*), 2.66 (t, *J* = 7.7 Hz, 1*H*), 2.31-2.02 (m, 3*H*), 1.62 (s, 3*H*), 1.54 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 174.94, 174.87, 170.76, 170.05, 156.43, 155.84, 132.17, 131.99, 121.90, 121.28, 118.35, 117.36, 42.57, 38.74, 36.93, 31.44, 25.72, 24.63 (2*C*), 24.58, 16.72, 16.54.

IR (fest): ν (cm⁻¹) = 2965 (w), 2917 (w), 1975 (w), 1686 (s), 1640 (s), 1412 (m), 1314 (m), 1280 (m), 1260 (m), 1224 (s), 1180 (m), 1129 (w), 1102 (w), 1020 (w), 929 (m), 874 (m), 863 (m), 802 (m), 741 (w), 722 (w), 699 (w), 671 (w), 599 (w), 528 (w).

HRMS (ESI-HR): berechnet für C₁₁H₁₆O₄: 212,1049, gefunden: 212,1057.

MS (EI, 70 eV): *m*/*z* (%) = 212 (5), 194 (6), 176 (1), 166 (10), 144 (6), 126 (19), 107 (5), 91 (2), 79 (2), 69 (100), 53 (3), 41 (24).

Synthese von 7-Methyl-3-oxo-oct-6-en-säuremethylester 133 (Yang et al., 2002)



133

Zu einer Suspension aus Natriumhydrid (1,32 g, 33 mmol, 1,1 eq, 23,99 g/mol, 60 % in Mineralöl) in absolutem THF (50 ml) wurde langsam unter Stickstoffatmosphäre Acetessigsäuremethylester (3,23 g, 30 mmol, 1 eq, 116,12 g/mol, d 1,08 g/ml) bei einer Temperatur von 0 °C zugetropft (Gasentwicklung). Nach 15 min unter Rühren bei 0 °C erfolgte dann die Zugabe von *n*-Butyllithium (20,6 ml, 33 mmol, 1,1 eq, 1,6 M in Hexan) zur Reaktionsmischung. Isoprenylbromid **37** (3,5 ml, 30 mmol, 149,04 g/mol, d 1,27 g/ml) wurde tropfenweise 1 Stunde später bei der gleichen Temperatur zugesetzt. Die Reaktion wurde für 16 Stunden bei RT gerührt. Nach Entfernen des Lösungsmittels unter Vakuum, wurde der Rückstand in Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und am Rotationsverdampfer eingeengt. Das Rohprodukt der Reaktion wurde über Säulenchromatographie an Kieselgel (20:1 PE/EA) gereinigt, wobei das Produkt als ein gelbliches Öl mit einer Ausbeute von 30 % (1,64 g, 9 mmol) dargestellt werden konnte.

R_f 0,39 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 5.10-5.01 (m, 1*H*), 3.74 (s, 3*H*), 3.45 (s, 2*H*), 2.64-2.49 (m, 2*H*), 2.33-2.20 (m, 2*H*), 1.68 (s, 3*H*), 1.61 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 202.48, 167.64, 133.16, 122.17, 52.32, 49.10, 43.05, 25.65, 22.21, 17.64.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2917 (w), 1746 (s), 1716 (s), 1629 (w), 1437 (m), 1407 (w), 1377 (w), 1317 (m), 1238 (m), 1173 (m), 1079 (w), 1038 (w), 997 (w), 832 (w), 656 (w), 572 (w).

GC/MS (EI): *m/z* (%) = 184 (1), 166 (3), 152 (2), 141 (25), 125 (14), 116 (9), 109 (100), 101 (6), 95 (8), 87 (6), 81 (40), 74 (2), 69 (29), 63 (2), 55 (17).

Synthese von S-Phenyl-3-oxo-butan-thioat 143 (Yaggi & Douglas, 1977)



In einem ausgeheiztem Reaktionskolben wurden unter Stickstoffatmosphäre nacheinander Diketen (0,35 ml, 4,5 mmol, 84,08 g/mol, d 1,09 g/ml) und Thiophenol (459 µl, 4,5 mmol, 110,18 g/mol, d 1,08 g/ml) in absolutem DCM (3 ml) gelöst. Unter Rühren erfolgte die Zugabe von Triethylamin (2 Tropfen). Der Reaktionsansatz wurde bei RT über Nacht gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt und zur Reinigung des Rückstandes eine Säulenchromatographie an Kieselgel (20:1 PE/EA) durchgeführt. Der Aktivester als Produkt der Reaktion konnte mit einer Ausbeute von 68 % (594 mg, 3,1 mmol) als rote, ölige Flüssigkeit erhalten werden.

Die Verbindung liegt als Mischung aus Keto- und Enol-Form vor.

R_f 0,36 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 12.57 (s, 0.3*H*), 7.51-7.41 (m, 5*H*), 5.49 (s, 0.3*H*), 3.76 (s, 1.4*H*), 2.29 (s, 2*H*), 1.96 (s, 1*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 119.56, 193.25, 190.54, 174.75, 135.06, 134.45, 129.92, 129.65, 129.41, 129.40, 129.23, 126.93, 98.84, 57.79, 30.36, 21.20.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 3062 (w), 1723 (s), 1693 (s), 1618 (s), 1478 (m), 1440 (m), 1399 (m), 1359 (m), 1293 (m), 1191 (m), 1156 (m), 1096 (m), 1077 (s), 1024 (m), 998 (m), 967 (s), 930 (w), 823 (s), 744 (s), 707 (m), 688 (s), 589 (m), 559 (m), 547 (m).

MS (EI, 70 eV): *m*/*z* (%) = 194 (23), 168 (3), 153 (2), 137 (1), 125 (1), 110 (100), 85 (54), 77 (3), 65 (5), 51 (1), 43 (14).

Synthese von S-Phenyl-7-methyl-3-oxo-oct-6-en-thioat 144 (Yang et al., 2002)



Unter Stickstoffatmosphäre wurde zunächst eine Suspension aus Natriumhydrid (84 mg, 2,09 mmol, 1,1 eq, 23,99 g/mol, 60 % in Mineralöl) in 3 ml absolutem THF hergestellt. Das Thiophenolderivat 143 (0,3676 g, 1,9 mmol, 1 eq, 194,25 g/mol) wurde vorsichtig bei einer Temperatur von 0 °C dem Ansatz zugetropft. Nach 15 minütigen Rühren erfolgte die Zugabe von *n*-Butyllithium (1,3 ml, 2,09 mmol, 1,1 eq, 1,6 M in Hexan). Der Reaktionsansatz wurde für weitere 60 Minuten gerührt, bevor die Zugabe von Isoprenylbromid 37 (223µl, 1,9 mmol, 1 eq, 149,04 g/mol, d 1,27 g/ml) tropfenweise erfolgte. Die Mischung wurde für weitere 3 Stunden gerührt. Zur Aufarbeitung der Reaktion wurde das Lösungsmittel im Anschluß unter Vakuum entfernt, der Rückstand in demineralisiertem Wasser gelöst und mit Diethylether (3×) extrahiert. Nach Waschen der vereinigten organischen Phasen mit demineralisiertem Wasser wurde die wässrige Phase mit 2 N HCl angesäuert und erneut mit Diethylether (3×) extrahiert. Die Etherphasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und unter Vakuum eingeengt. Die Reinigung des Rückstandes erfolgte über Säulenchromatographie an Kieselgel (20:1 PE/EA) und über semi-präparativer HPLC (20:1 PE/EA). Dabei konnte das Produkt als rötliches Öl mit einer Ausbeute von 33 % (163 mg, 0,62 mmol) dargestellt werden.

Die Verbindung liegt als Mischung aus Keto- und Enol-Form vor.

R_f 0,49 (10:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 12.55 (s, 0.35*H*), 7.53-7.39 (m, 5*H*), 5.48 (s, 0.35*H*), 5.12-5.01 (m, 1*H*), 3.74 (s, 1.3*H*), 2.64-2.54 (m, 1.3*H*), 2.33-2.16 (m, 2.7*H*), 1.70 (s, 1.05*H*), 1.67 (s, 1.95*H*), 1.61 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 201.60, 193.26, 190.55, 177.68, 135.05, 134.46, 134.45, 133.33, 133.23, 129.86, 129.63, 129.38, 129.37, 129.22, 127.13, 127.04, 122.20, 122.15, 98.27, 57.06, 43.30, 35.21, 25.69, 24.83, 22.19, 17.71.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 2980 (w), 2923 (m), 2856 (w), 1724 (m), 1697 (m), 1615 (s), 1478 (w), 1441 (m), 1402 (m), 1377 (m), 1292 (w), 1177 (m), 1096 (m), 1077 (s), 1043 (w), 1024 (m), 977 (m), 913 (w), 854 (m), 804 (m), 744 (s), 706 (m), 688 (s), 623 (w). HRMS (ESI-HR): berechnet für C₁₅H₁₈O₂S, M + nNa: 285,0920, gefunden: 285,0904.

MS (ESI): m/z (%) = 285 (100) [C₁₅H₁₈O₂S, M + nNa], 263 (21), 245 (11), 203 (13), 186 (2), 153 (11), 137 (3), 109 (3).

Synthese von 3-Oxo-butansäurebenzylester 147 (Mottet et al., 1999, Yang et al., 2001)



Unter Stickstoffatmosphäre wurden in einem ausgeheiztem Reaktionskolben zunächst Acetessigsäuremethylester (2,15 ml, 20 mmol, 116,12 g/mol, 1,08 g/ml) und Benzylalkohol (10,4 ml, 0,1 mol, 5 eq, 108,14 g/mol, 1,04 g/ml) in absolutem Toluol (120 ml) gelöst. Dann erst erfolgte die Zugabe vom Bortrifluoridetherat (BF₃Et₂O, 0,51 ml, 4 mmol, 0,2 eq, 141,93 g/mol, 1,12 g/ml) zur Reaktionsmischung. Der Ansatz wurde für 18 Stunden bei einer Temperatur von 100 °C unter Rückfluss erhitzt. Nach Abkühlen des Ansatzes auf RT wurde dieser direkt unter Vakuum eingeengt. Das so erhaltene Rohprodukt wurde über Säulenchromatographie mittel Kieselgel (5:1 PE/EA) in einer Ausbeute von 62 % als gelbe Flüssigkeit erhalten (2,37 g, 12,3 mmol).

 $\mathbf{R_f}$ 0,35 (5:1 Petrolether/Ethylacetat)

¹**H-NMR** (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 7.45-7.28 (m, 5*H*), 5.18 (s, 2*H*), 3.50 (s, 2*H*), 2.25 (s, 3*H*).

¹³**C-NMR** (63 MHz, CDCl₃): δ (ppm) = 200.37, 166.96, 135.29, 128.65, 128.51, 128.40, 67.16, 50.06, 30.17.

IR (Film): ν (cm⁻¹) = 3035 (w), 2958 (w), 1739 (s), 1714 (s), 1648 (w), 1499 (w), 1455 (w), 1409 (w), 1360 (m), 1313 (m), 1263 (m), 1145 (s), 1082 (w), 1028 (m), 1003 (w), 966 (m), 910 (w), 804 (w), 747 (m), 697 (s), 601 (w), 581 (w), 540 (w).

MS (EI, 70 eV): *m*/*z* (%) = 192 (23), 174 (1), 164 (17), 146 (1), 132 (1), 107 (57), 91 (100), 79 (6), 58 (7), 51 (1), 43 (6), 39 (1).

5. Diskussion

5.1. Situation in *P. aeruginosa*

Wie bereits in Kapitel 2.6 beschrieben, wurde der Abbau von azyklischen Terpenoiden, bei welchen die Umsetzung über β -Oxidation im Fettstoffwechsel durch eine störende β -ständige Methylgruppe verhindert wird, erstmals in den 60iger Jahren durch Seubert und Mitarbeiter anhand des isolierten Stammes *P. citronellolis* untersucht, wobei der Schwerpunkt dieser Arbeiten auf den durch die Enzyme Geranyl-CoA Carboxylase, Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase und 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase katalysierten Reaktionen gelegt wurde (Seubert, 1960; Seubert et *al.*, 1963; Seubert & Remberger, 1963; Seubert & Fass, 1964a; Seubert & Fass, 1964b). Durch ihre Untersuchungen konnten die Wissenschaftler erstmals einen Stoffwechselweg für den Abbau von Citronellol und Geraniol vorschlagen (Seubert & Fass, 1964b; Kap.2.6, Abb. 2.7-2.10).

Durch Fall und Mitarbeiter wurde die Untersuchung des Abbaus von Citronellol in den 70iger Jahren weiter fortgeführt. Es stellte sich heraus, dass neben *P. citronellolis* auch *P. aeruginosa* und *P. mendocina* in der Lage sind, Citronellol und Geraniol zu verwerten (Cantwell et *al.*, 1978). Die Annahme von Seubert, bei der Geranyl-CoA Carboxylase von *P. citronellolis* handele es sich um ein durch das Wachstum auf Terpenoiden induzierbares Enzym, konnte durch die Arbeit von Hector & Fall (1976b) bestätigt werden. Während in dieser Arbeit auch gezeigt werden konnte, dass das Enzym nicht nur das Geranyl-CoA sondern auch Methylcrotonyl-CoA als Substrat umsetzt, konnte in einer nachfolgenden Arbeit die Struktur des Enzyms als globuläres Protein mit einer molekularen Masse zwischen 520 und 580 kDa und einer wahrscheinlichen A₄B₄-Stöchiometrie postuliert werden (Fall & Hector, 1977).

Basis für aktuellere Untersuchungen des Abbauweges war die vollständige Sequenzierung des Genoms des Stammes *P. aeruginosa* PAO1 (Stover et *al.*, 2000; Windsor et *al.*, 2005). Dadurch war es möglich, folgend zwei Gencluster zu identifizieren, welche am Abbau von Citronellol beteiligt sind. Es handelte sich dabei um das *atu* (*acyclic terpene utilisation*) und das *liu* (*leucine/isovalerate utilisation*) Gencluster (Diaz-Perez et *al.*, 2004; Höschle et *al.*, 2005; Aguilar et *al.*, 2006; Förster-Fromme et *al.*, 2006; Abb. 5.1). Durch verschiedene Experimente konnte schließlich gezeigt werden, dass *atuC* und *atuF* die α - und β -Untereinheiten der Geranyl-CoA Carboxylase und *liuB* und *liuC* die α - und β -Untereinheiten der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase codieren (Höschle et *al.*, 2005). Im Unterschied zum

liu-Gencluster, welches in diversen *Pseudomonaden* identifiziert werden kann (Höschle et *al.*, 2005; Förster-Fromme et *al.*, 2006), kann das *atu*-Gencluster nur in einigen wenigen *Pseudomonaden*, mit Fähigkeit zum Citronellolabbau, und wenigen marine Mikroorganismen nachgewiesen werden (Höschle et *al.*, 2005; Förster-Fromme & Jendrossek, 2006)



Abb. 5.1: Relative Positionen der Gene im *atu-* und *liu-*Gencluster in *P. aeruginosa* (nach Höschle et *al.*, 2005; Förster-Fromme et *al.*, 2006)

Durch Datenbankvergleiche konnte weiteren Genen des Atu- und Liu-Weges hypothetische Funktionen zugeordnet werden (Förster-Fromme et *al.*, 2006) und in nachfolgenden Studien war es bereits möglich, einige dieser Funktionen experimentell zu bestätigen (Förster-Fromme & Jendrossek, 2010, Tab. 5.1).

Durch den Einsatz von Gensonden, welche spezifisch für *atu*-Gene von *P. aeruginosa* PAO1 waren, konnte auch im Genom von *P. citronellolis* das *atu*-Gencluster identifiziert werden. Nach Klonierung und Sequenzierung war es folgend für dieses möglich eine sehr hohe Identität auf DNA- und Aminosäureebene zum Gencluster in *P. aeruginosa* PAO1 festzustellen (Förster-Fromme & Jendrossek, 2006).

PA Nr.	Protein	Vorgeschlagene Funktion	experimentell nachgewiesene Funktion
2885	AtuR	Repressor der atu Gen Expression	Förster-Fromme & Jendrossek, 2010a
2886	AtuA	Unbekannt	
		3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-	
		CoA:Acetat Lyase?	
2887	AtuB	Dehydrogenase	
2888	AtuC	Geranyl-CoA Carboxylase, β-Untereinheit	Höschle et <i>al.</i> , 2005; Aguilar et <i>al.</i> , 2008
2889	AtuD	Citronellyl-CoA Dehydrogenase	Förster-Fromme et al., 2008
2890	AtuE	Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase	
2891	AtuF	Geranyl-CoA Carboxylase, α-Untereinheit	Höschle et <i>al.</i> , 2005; Aguilar et <i>al.</i> , 2008
2892	AtuG	Dehydrogenase	
2893	AtuH	Acyl-/Citronellyl-CoA Synthetase	
2016	LiuR	Transkriptionsregulator des liu Genclusters	
2015	LiuA	Isovaleryl-CoA Dehydrogenase	Förster-Fromme &
2014	LinB	Methylcrotonyl-CoA Carboxylase	Höschle et <i>al.</i> , 2005;
2011	Liub	β-Untereinheit	Aguilar et al., 2008
2013	LiuC	3-Methyl-glutaconyl-CoA Hydratase	
2012	LiuD	Methylcrotonyl-CoA Carboxylase,	Höschle et al., 2005;
		α-Untereinheit	Aguilar et <i>al.</i> , 2008
2011	LiuE	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA Lyase	Chavez-Aviles et al., 2009
4640	MqoB	Malate:Quinone Oxidoreduktase	Förster-Fromme &
2634	AceA	Isocitrate Lyase	Diaz-Perez et al., 2007
1535	AtuD2	Acyl-CoA Dehydrogenase	Förster-Fromme et al., 2008
1982	ExaA	PQQ-abhängige Alkohol Dehydrogenase	Chattopadhyay et al., 2010
3028	MoeA2	Molybden-Cofaktor Biosynthese Protein A2	Höschle & Jendrossek, 2005

Tab. 5.1:Gene, Proteine und die entsprechend zugeordneten Funktionen im Stoffwechselweg zur
Verwertung von azyklischen Terpenoiden und Isovalerate in *P. aeruginosa* und
P. citronellolis nach Förster-Fromme & Jendrossek, 2010

Mittels früherer Studien war es somit möglich bereits einige Funktionen von Genen des Clusters dem Atu-Stoffwechselweg zuzuordnen und die entsprechenden Proteine näher zu charakterisieren (Tab. 5.1). Im Falle des *atu*-Clusters handelte es sich dabei um AtuR als Repressor des *atu*-Genclusters (Förster-Fromme & Jendrossek, 2010a), AtuD als Citronellyl-

CoA Dehydrogenase (Förster-Fromme et *al.*, 2008) und um AtuC/AtuF als die beiden Untereinheiten der Geranyl-CoA Carboxylase (Höschle et *al.*, 2005; Förster-Fromme et *al.*, 2006; Aguilar et *al.*, 2008).

Die Untersuchung von AtuC und AtuF beschränkte sich dabei zunächst auf die Klärung der Funktion als Carboxylase des Atu-Weges und somit den Nachweis der Expression der jeweiligen Gene bzw. die Synthese der Proteine in entsprechend induzierten Zellen. Des Weiteren erfolgten erste Aktivitätsbestimmungen von Rohextrakten mit Geranyl- und Methylcrotonyl-CoA (Höschle et *al.*, 2005; Förster-Fromme et *al.*, 2006).

Für die Enzymabfolge des "lower atu pathways", welche mit der Reaktion der Geranyl-CoA Carboxylase (GCase) startet und schließlich in der Reaktion der 3-Hydroxy-3-isohexenylglutaryl-CoA:Acetat Lyase endet, konnten noch keine weiteren Erkenntnisse erzielt werden. Lediglich die Studien von Seubert und Mitarbeitern beschäftigten sich mit den Enzymen, welche der Carboxylase nachfolgen (Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase und 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase, Seubert et al., 1963; Seubert & Fass, 1964a). Letztendlich konnte die Zuordnung von AtuE als Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase und AtuA als mögliche 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase noch nicht experimentell bestätigt werden. Allerdings konnte durch eine Insertionsmutante von P. aeruginosa PAO1 im Gen atuA eine essentielle Rolle von AtuA im Citronellolabbau gezeigt werden, da die Mutation, bei der das Plasmid pKnockout-G (Windgassen et al., 2000) in das Gen integriert wurde, zum Verlust der Fähigkeit führte, Citronellol und Geraniol verwerten zu können (Förster-Fromme et al., 2006). Die entsprechende Mutante von P. citronellolis zeigte ebenfalls diesen Phänotyp, wobei durch Rekonstitutionsanalysen mit atuA in trans der Wildtypphänötyp wieder hergestellt werden konnte (Förster-Fromme & Jendrossek, 2006). Im Gegensatz dazu zeigte die Mutation im atuE Gen keinen Effekt auf das Vermögen auf azyklischen Terpenoiden wachsen zu können. Die Funktion von AtuE scheint somit wichtig aber nicht essentiell für die Verstoffwechselung von Citronellol zu sein (Förster-Fromme et al., 2006). Es wird vermutet, dass die Funktion der Isohexenylglutaconyl-CoA Hydratase durch andere Isoenzyme aufrechterhalten werden kann (Förster-Fromme et *al.*, 2006).

5.2. Aktivität der Wildtyp Geranyl-CoA Carboxylase

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst das Schlüsselenzym des Citronellolstoffwechsels die Geranyl-CoA Carboxylase näher untersucht. Schon in den 60iger Jahren erfolgte durch Seubert und Mitarbeiter eine Aufreinigung und nähere Charakterisierung des Enzyms aus *P. citronellolis* (Seubert et *al.*, 1963). Die Wissenschaftler stellten in diesen Arbeiten fest, dass das Enzym durch das Wachstum mit Citronellol als C-Quelle im Kulturmedium induziert wird und nur das *cis*-Geranyl-CoA als Substrat verwertet. Durch spätere Arbeiten konnte dann gezeigt werden, dass auch die Geranyl-CoA Carboxylase aus *P. aeruginosa* ein durch das Wachstum auf Isoprenoiden als C-Quelle induzierbares Enzym ist (Höschle et *al.*, 2005). Des Weiteren konnten durch Verwendung von Rohextrakten von *P. aeruginosa* PAO1 Zellen Carboxylase-Aktvitäten bestimmt werden. Diese betrugen mit Rohextrat von Citronellsäure Zellen 15 mU/mg mit GCoA und 33 mU/mg mit MCoA als eingesetztes Substrat eine Aktivität von 45 mU/mg bestimmt werden (Förster-Fromme et *al.*, 2006).

Auch in dieser Arbeit wurden zunächst *P. aeruginosa* PAO1 Zellen mit Glukose, Isovaleriansäure bzw. Citronellsäure als C- und Energiequelle im Medium angezogen. Die aus diesen Zelle gewonnenen Rohextrakte wurden dann in die entsprechenden Untersuchungen eingesetzt, wobei vergleichbare Aktivitäten zu vorangegangenen Arbeiten erhalten werden konnten (Kap.4.2). Es zeigte sich, dass weder eine signifikante MCase noch GCase Aktivität nach Wachstum auf Glukose beobachtet werden konnte. Rohextrakte von Citronellsäure-Zellen zeigten dagegen eine MCase (47 mU/mg) und GCase Aktivität (11 mU/mg), und damit einen funktionstüchtigen Atu- und Liu-Weg. Wurde dagegen Rohextrakt von Zellen, welche mit Isovaleriansäure angezogen wurden, getestet, so konnte zwar eine MCase Aktivität (54 mU/mg), aber keine GCase Aktivität bestimmt werden. Dieses Ergebnis bestätigt die Tatsache, dass die Geranyl-CoA Carboxylase und damit der Atu-Weg lediglich durch Wachstum auf Isoprenoiden induziert wird.

Im Folgenden wurden die beiden Carboxylasen (GCase und MCase) aus den Rohextrakten über ihre Biotin-haltige Untereinheit unter Verwendung von Avidin-Gel partiell aufgereinigt. Mittels SDS-PAGE und Western-Blot Analyse konnten die einzelnen Untereinheiten der Enzyme zugeordnet werden. Während in mit Glukose gewachsenen Zellen lediglich die beiden Untereinheiten eines Biotin-haltigen Proteins nachweisbar waren (konstitutiv exprimiert, putative Acetyl-CoA Carboxylase), konnten aus Citronellsäure-Zellen zusätzlich die Untereinheiten der Geranyl-CoA und der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase isoliert werden. Wurde der Rohextrakt von Isovaleriansäurezellen der Reinigung unterzogen, so konnten neben der putativen Acetyl-CoA Carboxylase lediglich die Untereinheiten der MCase erhalten werden. Die partielle Reinigung der Wildtypenzyme konnte somit auch in dieser Arbeit erfolgreich durchgeführt werden.

Probleme ergaben sich dagegen bei der Untersuchung der Aktivitäten der so gereinigten Carboxylasen mit Geranyl- und Methylcrotonyl-CoA. Beide Substrate, welche auch schon bei der Messung der Aktivitäten der Rohextrakte eingesetzt wurden, wurden im Labor über die Methode des gemischten Anhydrids nach Guan et *al.* (1999; Förster-Fromme et *al.*, 2006) hergestellt. Neben diesen stand auch kommerziell erhältliches MCoA zur Verfügung. Da bei Einsatz von selbstsynthetisiertem als auch gekauftem MCoA vergleichbare Aktivitäten erhalten werden konnten, wurde geschlussfolgert, dass die Synthese der CoA-Ester auf diesem Wege erfolgreich durchgeführt wurde. Nichtsdestotrotz konnte zu einem späteren Zeitpunkt auch eine Kontrolle der Proben über HPLC erfolgen (Kap.4.7.1). Da für das Geranyl-CoA keine käufliche Variante zur Verfügung stand, musste die Kontrolle über das parallel hergestellte Methylcrotonyl-CoA und die Bestätigung über die Masse (HPLC-(ESI)-MS Analyse) ausreichen.

War die Aufreinigung von Biotin-haltigen Proteinen über Avidin in verschiedenen Arbeiten erfolgreich und konnten nachfolgend mit diesen gereinigten Proben auch Aktivitäten gezeigt werden (Alban et *al.*, 1993; Chen et *al.*, 1993; Song et *al.*, 1994; Wang et *al.*, 1995; Bramwell et *al.*, 1996; Bott et *al.*, 1997; Mukhopadhyay et *al.*, 1998; Diacovich et *al.*, 2002; Chuakrut et *al.*, 2003), so war dies in der vorliegenden Arbeit lediglich für die Methylcrotonyl-CoA Carboxylase aus *P. aeruginosa* möglich. Wurden gereinigte Proteinfraktionen auf ihre Aktivität mit GCoA und MCoA hin untersucht, so konnten nur bei Verwendung von MCoA als Substrat signifikante Aktivitäten erhalten werden (Protein Cs-Zellen: 1900 mU/mg, Protein Iso-Zellen: 4600 mU/mg). Bei Einsatz von GCoA als Substrat war es nicht möglich signifikante Aktivitäten zu bestimmen.

Sowohl die Anzucht der Zellen als auch die Reinigung der entsprechenden Rohextrakte zur Gewinnung der einzelnen Enzymchargen wurden in der gleichen Art und Weise durchgeführt. Und auch die Bedingungen der einzelnen Assays waren vergleichbar. Dennoch wurden diese unterschiedlichen Ergebnisse erzielt. Mögliche Erklärungen für die fehlende Aktivität des Enzyms aus *P. aeruginosa* mit Geranyl-CoA als Substrat könnten in der Konzentration der Enzymlösung oder dem möglichen "falschen" Substrat zu finden sein. Eine weitere

Möglichkeit könnte das Fehlen einer Komponente im Rohextrakt, welche während der Aufreinigung über das Avidin-Gel-Säulenmaterial verloren geht, darstellen.

Die Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Aktivität konnte sowohl mit einer Enzymlösung gewonnen aus Rohextrakt von Isovaleriansäure-Zellen, als auch mit Enzym gewonnen aus Rohextrakt von Citronellsäure-Zellen erhalten werden. In beiden Fällen wurden dabei ähnliche Konzentrationen an Enzym in den Assay eingesetzt. Da dennoch nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine mögliche GCase Aktivität auf eine zu geringe Konzentration des Enzyms zurückzuführen war, wurde die eingesetzte Proteinlösung aufkonzentriert und in den entsprechenden Assay eingesetzt. Während jedoch auch mit einer geringeren Konzentration eine deutliche Abnahme der Absorption bei Einsatz von MCoA als Substrat beobachtet werden konnte, war auch bei Einsatz von höher konzentrierten Proteinproben keine GCase Aktivität über die Abnahme der Absorption festzustellen, wobei bis zu 100 µg Protein im Ansatz getestet wurden. Eine Erhöhung der Proteinmenge im Enzymassay veränderte somit nicht das Ergebnis.

Eine weitere Möglichkeit als Erklärung für die scheinbare Inaktivität der Geranyl-CoA Carboxylase könnte möglicherweise ein "falsches" Substrat darstellen. Da das Geranyl-CoA über seine Masse in der HPLC-(ESI)-MS Analyse bestätigt wurde, konnte ein "völlig falsches" Substrat in diesem Falle ausgeschlossen werden. Allerdings wurde für die Synthese des GCoAs ein Isomerengemisch der Geranylsäure als Edukt eingesetzt, sodass auch das GCoA als eine Mischung aus cis- und trans-Geranyl-CoA erhalten wurde. Schon durch Seubert et al. (1963) wurde das Vorliegen einer enzymatisch inaktiven Form festgestellt. Da der enzymatisch aktive Anteil der dort verwendeten GCoA Präparate in der Größenordnung des cis-Geranylsäuregehaltes der verwendeten Geranylsäurepräparate lag, wurde das cis-GCoA als Substrat der Geranyl-CoA Carboxylase vermutet (Seubert et al., 1963). Untermauert wurde diese Annahme durch Verwendung eines synthetischen Präparats, welches überwiegend trans-Geranylsäure enthielt. Entsprechende CoA-Ester dieser Säure zeigten nur noch einen geringen Anteil an aktivem Geranyl-CoA. Wurde dagegen die cis-Form der Säure durch fraktionierte Destillation angereichert und in die CoA-Ester Synthese eingesetzt, so wurde mit diesem Ester die höchste Ausbeute an "aktivem" Geranyl-CoA erhalten (Seubert et al., 1963). Nichtsdestotrotz von einer möglichen Hemmung des cis-GCoAs durch das trans-GCoA wurde noch nicht berichtet. Da mögliche hemmende Faktoren jedoch nicht ausgeschlossen werden können, wurde der Einfluss des GCoA Präparates auf die Reaktion mit MCoA untersucht. In den hier durchgeführten Experimenten konnte sehr wohl ein Einfluss festgestellt werden. Wurde zunächst GCoA in die Reaktion mit Protein aus

Citronellsäure-Zellen eingesetzt, so konnte wie auch bei Reaktionen zuvor keine Aktivität mit diesem Substrat festgestellt werden. Erfolgte im Anschluss die Zugabe von MCoA so resultierte ein Abfall der Absorption und eine signifikante Aktivität konnte berechnet werden. Bei erneuter Zugabe von GCoA verringerte sich der negative Anstieg um das Dreifache. Wurde die Reaktion dagegen mit MCoA als Substrat gestartet, so konnte eine deutlich höhere Aktivität aus der erhaltenen Absorptionsänderung berechnet werden. Diese lag um den Faktor 3,3 höher, als wenn die Reaktion zuvor mit GCoA gestartet wurde. Erfolgte daraufhin die Zugabe von zusätzlichem GCoA, so konnte ein deutliches Abflachen der Reaktion und eine um den Faktor 5 reduzierte Aktivität berechnet werden. Durch diese Experimente konnte gezeigt werden, dass zumindest die Reaktion mit Methylcrotonyl-CoA durch die Anwesenheit von Geranyl-CoA negativ beeinflusst wird. Es bleibt jedoch zu klären ob dieser negative Einfluss auf den Reaktionsverlauf durch das GCoA Präparat selbst oder durch in dieser Probe enthaltene Substanzen bewirkt wird. Weiterhin konnte an dieser Stelle nicht geklärt werden, ob das eingesetzte GCoA diesen Einfluss auch auf die Reaktion der GCase besitzt und somit einer signifikanten Absorptionsänderung entgegensteht.

Um Letzteres testen zu können, war die Darstellung von cis-Geranyl-CoA erforderlich. Da durch die, der Geranyl-CoA Carboxylase vorgeschalteten Reaktion, der Citronellyl-CoA Dehydrogenase direkt cis-GCoA aus Citronellyl-CoA generiert werden konnte, wurde im Verlauf dieser Arbeit eine Kopplung dieser beiden Enzyme getestet. Ein Enzymassay zum Verfolgen der Acyl-CoA Dehydrogenase Aktivität wurde dabei bereits in vorangegangenen Arbeiten etabliert (Kap.3.14.1., Chattopadhyay, 2007; Förster-Fromme et al., 2008; Förster-Fromme & Jendrossek, 2008). Die Übertragung der bei der Umsetzung der Substrate anfallenden Wasserstoffatome auf das Enzym, deren folgende Weitergabe bei der Regeneration der prostetischen Gruppe FAD an den Mediator PMS und letzendendlich die Aufnahme dieser durch den Elektronenakzeptor DCPIP_{ox} ermöglicht das Verfolgen der Reaktion bei einer Wellenlänge von 600 nm (Abb. 5.2). Die Reaktion kann dabei anhand einer Absorptionsänderung photometrisch betrachtet werden, da DCPIP_{ox} eine blaue Färbung aufweist und bei einer Wellenlänge von 600 nm absorbiert. Durch die Aufnahme der Wasserstoffatome vom PMS wird das DCPIPox zu DCPIPred reduziert und farblos (Chattopadhyay, 2007). Mit Hilfe dieses Enzymassays war es bereits in früheren Arbeiten möglich die Acyl-CoA Dehydrogenase des Atu-Weges AtuD (Citronellyl-CoA Dehydrogenase) zu bestätigen und näher zu charakterisieren (Förster-Fromme et al., 2008). Gleiches war auch für LiuA der Isovaleryl-CoA Dehydrogenase des Liu-Weges möglich (Förster-Fromme & Jendrossek, 2008). Obwohl somit zwei etablierte Enzymassays zur Verfügung standen, war eine Kopplung dieser jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht möglich, da es im Reaktionsgemisch mit NADH+H⁺, DCPIP_{ox} und PMS als Elektronen-Vermittler zu einer Entkopplung der Reaktionen kommt. Das NADH+H⁺ reagiert dabei mit DCPIP_{ox}, wobei dieses reduziert wird. Durch die Bildung von NAD⁺ und DCPIP_{red} wird die Konzentrationsabnahme auch bei Abwesenheit der Carboxylase sichtbar und eine Bestimmung der Aktivität unmöglich. Die direkte Darstellung von *cis*-Geranyl-CoA konnte somit auf diesem Wege nicht erfolgen.



Abb. 5.2: Elektonentransportkette im AuD-Assay nach Chattopadhyay, 2007.

Um die Citronellyl-CoA Dehydrogenase Reaktion dennoch zur Darstellung und Isolierung des *cis*-GCoAs zu nutzen, wurde in dieser Arbeit eine Trennung der beiden CoA-Ester mittels HPLC getestet. Allerdings war es unter den verschiedensten Bedingungen nicht möglich beide Ester (Kap.4.7.1.) signifikant voneinander abzugrenzen. Aufgrund des geringen Unterschiedes zwischen Citronellyl-CoA **18** und Geranyl-CoA **19**, welcher lediglich in dem Vorhandensein einer zusätzlichen Doppelbindung im Geranyl-CoA bestand (Abb. 5.3.), war dieses Ergebnis allerdings nicht verwunderlich. Vergleichend dazu konnten CoA Ester mit verschiedener Kettenlänge im HPLC-Chromatogramm gut unterschieden und getrennt dargestellt werden (CoA **148**, Acetyl-CoA **24**, 3-Methylcrotonyl-CoA **29**).



Abb. 5.3: Darstellung der Verbindungen Citronellyl-CoA 18 und Geranyl-CoA 19, sowie der im HPLC-Chromatogramm gut zu unterscheidenen Proben CoenzymA 148, Acetyl-CoA 24 und 3-Methylcrotonyl-CoA 29

Eine Möglichkeit die *cis*- und *trans*-Geranylsäure als Vorstufe des GCoAs getrennt darzustellen, eröffnete sich später durch die Arbeiten am Institut für Organischen Chemie. Zwar war eine Trennung der Doppelbindungsisomere durch Destillation vergleichend zu Seubert et *al.* (1963) in diesem Falle nicht möglich, jedoch konnte die Geranylsäure erfolgreich zum Geranylsäuremethylester umgesetzt werden. Auf dieser Stufe erfolgte dann die Trennung der Isomere über semi-präparative HPLC. Nach Verseifung des *cis*- und *trans*-Methylesters konnten die entsprechenden freien Säuren in die CoA-Ester Synthese eingesetzt werden. Auf diese Weise standen sowohl *cis*- als auch *trans*-GCoA für weitere Untersuchungen zur Verfügung.

Allerdings konnten bei Einsatz dieser Substrate nun keine zufriedenstellenden Ergebnisse mit den entsprechenden *P. aeruginosa* PAO1 Rohextrakten erhalten werden. Signifikante Aktivitäten waren lediglich mit Methylcrotonyl-CoA als Substrat (Iso-Zellen) über die Absorptionsänderung zu bestimmen (20 mU/mg). Bei der Verwendung von *cis-* und *trans-*GCoA konnten zwar geringe Aktivitäten berechnet werden, jedoch unterlagen diese Ergebnisse enormen Schwankungen, welche anhand der Standardabweichung im entsprechenden Diagramm verdeutlicht wurden (Abb. 4.50). Vergleichbare Aktivitäten wurden dabei bei Rohextrakt von Glukose-Zellen und Rohextrakt von Isovaleriansäure-Zellen erhalten. Nichtsdestotrotz auch der Rohextrakt von Citronellsäure-Zellen lieferte keine signifikant höheren Aktivitäten als die mit Rohextrakt von Glukose-Zellen. Werden jedoch auch die erhaltenen Ergebnisse mit MCoA als Substrat verglichen, so muss an dieser Stelle festgehalten werden, dass auch diese Aktivitäten deutlich reduziert waren, im Vergleich zu früheren Messungen (Abb. 4.51). Diese Tatsache lässt weniger aktive Enzymlösungen und/oder auch schlechteres Substrat vermuten. Bei Problemen von *P. aeruginosa* mit gegebenen Wachstumsbedingungen neigt dieser zur Aggregation bzw. zum Ausflocken im Kulturmedium und eine brauchbare Anzucht wird verhindert. Dies konnte bei der Anzucht der Zellen, aus welchen die eingesetzten Rohextrakte gewonnen wurden, jedoch nicht festgestellt werden. Auch wurden die titrierten Säuren als C-Quelle (Isovaleriansäure, Citronellsäure) einer schon zuvor verwendeten Stammlösung entnommen. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass bei der Anzucht von *P. aeruginosa* die damit einhergehende Induktion des Liu-Weges (Iso-Zellen) bzw. des Atu- und des Liu-Weges (Cs-Zellen) nicht gelang. Um weitere Aussagen treffen zu können, wären Messungen mit neuen Rohextrakten als Quelle der entsprechenden Enzyme notwendig. Diese waren allerdings aus Zeitgründen im Verlauf dieser Arbeit nicht mehr möglich. Ein denkbares, schlechteres MCoA Substrat konnte dagegen durch Messungen an anderer Stelle ausgeschlossen werden, denn bei der Verwendung von gereinigter, rekombinanter Methylcrotonyl-CoA Carboxylase aus *E. coli* war es möglich signifikante Aktivitäten bis zu 1200 mU/mg zu bestimmen.

Dennoch, wurden die erhaltenen Mittelwerte der Carboxylase-Aktivitäten mit cis- und trans-GCoA mit der Aktivität, welche mit dem früheren GCoA-Präparat (Isomerenmischung) erhalten wurde (RE Iso, RE Cs) verglichen, so kann das Aktivitätslevel der Mischung lediglich durch den Einsatz von cis-GCoA als Substrat erreicht werden. Bei Verwendung von trans-GCoA konnte vergleichend dazu im Mittel eine nur geringere Aktivität berechnet werden. Dies würde die Vermutung von Seubert et al. (1963) unter Verwendung der reinen Isomere bestätigen, jedoch sind eindeutige Aussagen aufgrund der zu geringen Aktivitäten, welche zumal im Bereich der Aktivitäten erhalten mit Rohextrakt von Glukose-Zellen liegen, nicht möglich. Aufgrund dieser Tatsache konnten auch bei der Untersuchung eines möglichen Einflusses der einzelnen Geranyl-CoA Isomere auf das jeweils andere Isomer keine stichhaltigen Ergebnisse erhalten werden. Bei erfolgter Zugabe eines Isomers konnte in parallelen Reaktionen sowohl eine "Hemmung" durch Abflachen des Reaktionsverlaufes, als auch eine unbeeinflusste Reaktion beobachten werden. Dabei war es egal, ob zunächst der Einfluss von trans-GCoA auf das cis-Isomer oder der Einfluss von cis-GCoA auf trans-GCoA getestet wurde. Letztendlich kann eine Hemmung von cis-GCoA durch trans-GCoA bzw. von trans-GCoA durch cis-GCoA nicht eindeutig bewiesen werden. Aufgrund der sehr geringen vorliegenden GCase Aktivitäten kann diese jedoch auch nicht ausgeschlossen werden. Somit sind in diesen Fällen ebenfalls neue Messungen mit neuen Enzymlösungen unbedingt erforderlich, um eindeutige Aussagen treffen zu können.

Auch wenn eine mögliche Inaktivität der Geranyl-CoA Carboxylase durch das verwendete GCoA Substrat nicht ausgeschlossen werden konnte, so wurde dennoch auch die Möglichkeit getestet, diese über eine fehlende Komponente in den gereinigten Proteinfraktionen zu erklären. Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden lediglich angereichertes Enzym aus P. citronellolis, welches folgend gereinigt wurde (Seubert et al., 1963; Fall & Hector, 1977) oder Rohextrakte von P. aeruginosa (Förster-Fromme et al., 2006) in Messungen zur Enzymaktivität eingesetzt. Die Reinigung bei Seubert und Mitarbeitern erfolgte dabei über Protaminsulfatfällung, Geladsorption, Ammoniumsulfatfällung, Fraktionierung mit gesättigter Ammomniumsulfatlösung und Chromatographie an DEAE-Cellulose. Bei Fall und Hector wurde die Reinigung ebenfalls durch Ammoniumsulfat-Fraktionierung, sowie Ionen-Austausch- und Gelfiltrations-Chromatographie erreicht. Die Aktivität von über Avidin-Gel gereinigten Enzymlösungen aus P. aeruginosa wurde dagegen noch nicht untersucht. Da eine Reinigung hier über die Biotin-haltige Untereinheit der Carboxylase erfolgt, wäre es denkbar, dass mögliche Faktoren, die für die Funktion des Enzyms eine Rolle spielen könnten, während der Ein-Schritt-Chromatographie von der Säule schon mit den Waschritten eluieren und somit dem Enzym verloren gehen. Ein Aktivitätsverlust nach Aufreinigung von Proteinen über ein Avidin-Material wurde soweit bekannt noch nicht beschrieben und auch die Funktion der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase wird scheinbar nicht durch diese Art der Aufreinigung beeinflusst. Nichtsdestotrotz könnte dies doch für die Geranyl-CoA Carboxylase eine Rolle spielen. Um zu testen, ob möglicherweise Faktoren im Rohextrakt, welche im gereinigten Protein fehlen, einen Einfluss auf die Aktivität der Geranyl-CoA Carboxylase zeigen, wurde gereinigte Proteinlösung mit Rohextrakt von P. aeruginosa gemischt, auf Eis inkubiert bzw. direkt in die Messungen eingesetzt. Ein Einfluss von Rohextrakt auf die Aktivität der GCase konnte allerdings bei diesen Untersuchungen nicht festgestellt werden. Eine mögliche Aktivität der Geranyl-CoA Carboxylase konnte durch Zugabe von Rohextrakt nicht wiederhergestellt werden. Die zu beobachtende Abnahme der Absorption in den einzelnen Reaktionsverläufen entsprach den Reaktionen, in welchen der entsprechende Rohextrakt allein eingesetzt wurde und war somit auf dessen Aktivität zurückzuführen. Doch trotz dieser Ergebnisse und des Umstandes, dass die über die gleiche Methode gereinigte Methylcrotonyl-CoA Carboxylase aus P. aeruginosa aktiv ist, kann letztendlich nicht ausgeschlossen werden, dass das Fehlen von zusätzlichen Faktoren in der gereinigten Proteinlösung einen Aspekt bei der nicht vorhandenen Aktivität der GCase darstellt. Nicht zuletzt muss geklärt werden, ob eine Beeinflussung der beiden GCoA Doppelbindungsisomere durch das jeweils andere Isomer in der Carboxylase Reaktion erfolgt. Erst wenn mit dem "richtigen" Substrat signifikante Aktivitäten mit gereinigter GCase erhalten werden können, ist es möglich weiterführende Fragestellungen zu beantworten.

Bei Hector und Fall (1976b) wurde nach der Reinigung der Propionyl-CoA Carboxylase aus P. citronellolis via Ammoniumsulfat Fraktionierung ein starker Verlust der Enzymaktivität beschrieben. Die Aktivität konnte jedoch durch Mischen von einzelnen Fraktionen wieder hergestellt werden. Diese Separation von funktionellen Untereinheiten durch einen instabilen Enzymkomplex in vitro wurde allerdings nicht bei der Reinigung der Acetyl-CoA Carboxylase aus P. citronellolis beobachtet (Hector & Fall, 1976b), dafür jedoch für das entsprechende Enzym aus E. coli (Alberts & Vagelos, 1972; Guchhait et al., 1974). Im Falle der hier untersuchten Geranyl-CoA Carboxylase kann ein Verlust der Aktivität durch eine Trennung der Untereinheiten durch die Instabilität des Enzyms allerdings ausgeschlossen werden. Bei der Reinigung über das Säulenmaterial Avidin-Gel, welche über SDS-PAGE kontrolliert wurde, konnten jeweils beide Untereinten der Geranyl-CoA und der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase erhalten werden. Des Weiteren war es Fall und Hector (1977) nach Reinigung der beiden Enzyme GCase und MCase aus P. citronellolis möglich, Aktivitäten über den Einbau von radioaktivem [¹⁴C]CO₂ bzw. über einen "Spektral Assay" zu bestimmen. Mittels Fraktionen, welche nach dem letzten Reinigungsschritt (Chromatographie an Hydroxylapatit) erhalten wurden, konnte eine Aktivität für die MCase (gereinigt aus Rohextrakt von Isovaleriansäure-Zellen) von 1054 mU/mg und eine Aktivität der GCase (gereinigt aus Rohextrakt von Citronellsäure-Zellen) mit 838 mU/mg angegeben werden. Auch eine Reinigung der Geranyl-CoA Carboxylase aus den Plastiden von Maisblättern war erfolgreich und ermöglichte eine Charakterisierung des Enzyms (Guan et al., 1999). Aufgrund des kontinuierlichen Auf- und Abbaus von vielen verschiedenen Isoprenoiden, welche als Wachstumsregulatoren, in der Photosynthese, der Atmung, dem Aufbau von Membranen, sowie bei der Anlockung und Verteidigung von Insekten und bei der biotischen-Stressantwort eine Rolle spielen, liegt das Enzym in Pflanzen generell angereichert vor. Durch Guan und Mitarbeiter konnten mit dem Enzym mit GCoA (200 µM) Aktivitäten im Bereich von 100 mU/mg erhalten werden. Dagegen zeigte es im Gegensatz zum bakteriellen Enzym keine Aktivität mit MCoA als Substrat. Die erhaltenen kinetischen Parameter für diese Geranyl-CoA Carboxylase sind K_m 64 \pm 5 μM für GCoA und V_{max} 148 \pm 16 nmol min $^{-1}$ mg $^{-1}$ an Protein, $K_m 0.58 \pm 0.04$ mM für HCO₃⁻ und $V_{max} 90 \pm 6$ nmol min⁻¹ mg⁻¹ an Protein und $K_m 8,4 \pm 0,4 \mu M$ für ATP und $V_{max} 90 \pm 4$ nmol min⁻¹ mg⁻¹ an Protein (Guan et *al.*, 1999). Das pflanzliche Enzym zeigt sowohl strukturelle als auch biochemische Unterschiede zur Geranyl-CoA Carboxylase aus P. citronellolis. So ist die Biotin-haltige Untereinheit des pflanzlichen Enzyms z.B. mit 122 kDa wesentlich größer, als die entsprechende Untereinheit der GCase in *P. citronellolis* (73 kDa). Weiterhin kann das pflanzliche Enzym lediglich GCoA als Substrat umsetzen, wohingegen das bakterielle Enzym neben GCoA auch MCoA (C5) und Farnesyl-CoA (C15) als Substrat akzeptiert (Fall, 1981). Die Aktivität der Geranyl-CoA Carboxylase konnte auch in Blättern von weiteren Pflanzen (*Nicotiana tabaccum, Daucus carota* und *Glycine max*) beobachtet werden (Guan et *al.*, 1999).

Nichtsdestotrotz gelang es später auch Aguilar et *al.* (2008), die Enzyme Methylcrotonyl-CoA und Geranyl-CoA Carboxylase aus *P. aeruginosa* zu reinigen und näher zu charakterisieren. Beide Enzyme zeigen zwei wichtige Domänen, die Acyl-CoA- und die Carboxybiotin-Bindedomäne, welche an der Übertagung der Carboxylgruppe auf das Acyl-CoA Substrat beteiligt sind (Kimura et *al.*, 2000). Beide Biotin-haltige α -Untereinheiten LiuD und AtuF zeigen vier hochkonservierte Domänen in Acyl-CoA Carboxylasen. Dabei handelt es sich um die ATP-Bindestelle (GGGGKGM), die CO₂ Fixierungsdomäne (RDCS), das katalytische Zentrum der Biotin-abhängigen Carboxylase Familie (EMNTR) und die Biotin-Carboxyl-Carrier-Domäne (AMKM) (Aguilar et *al.*, 2008).

Die Aufreinigung der Carboxylasen erfolgte auch in dieser Arbeitsgruppe über die Biotinhaltigen Untereinheiten mit Hilfe von Avidin-Agarose, wobei die Bestimmung der Aktivität der gereinigten Fraktionen folgend über die Messung der Radioaktivität, bewirkt durch den Einbau von ¹⁴CO₂, erfolgte. Für die so gereinigte MCase konnte folgend ein optimaler pH und die optimale Temperatur für die Aktivität bestimmt werden. Dieser lag bei einem pH von 8,5 und einer Temperatur von 37 °C. Weiterhin konnte mit ansteigenden Konzentrationen an MCoA Substrat eine sigmoidale Kinetik der MCase-Aktivität beobachtet werden. Die Ermittlung der entsprechenden kinetischen Konstanten lieferte für das Substrat MCoA einen K_{0.5} (Affinitätskonstante für Nicht-Michaelis-Menten Kinetik Verhalten) von 9,2 µM und ein V_{max} von 425 nmol min⁻¹ mg⁻¹ an Protein. GCoA wurde unter diesen Bedingungen dagegen nicht umgesetzt. Die MCase von P. aeruginosa erkannte spezifisch das MCoA als Substrat und besitzt keine GCase Aktivität. Dieses Verhalten zeigte auch schon die MCase aus P. citronellolis (Hector & Fall, 1976a; Hector & Fall, 1976b; Fall, 1981) bzw. die MCase aus den Mitochondrien höherer Pflanzen (Alban et al., 1993). Ein Unterschied der MCase aus P. aeruginosa zum Enzym aus P. citronellolis stellt die scheinbare 5-fach höhere Affinität zum MCoA dar (K_{0.5} von 9,2 µM und 43 µM). Wurde dagegen Rohextrakt von Citronellol gewachsenen Zellen aufgereinigt, so wurden sowohl die MCase als auch die GCase erhalten. Unter diesen Bedingungen zeigte sich ein ähnliches Verhalten mit beiden Substraten (sigmoidale Kinetik mit ähnlichen kinetischen Konstanten). Als Konstanten für MCase und GCase Aktivität wurden in diesem Fall $K_{0.5}$ von 8.84 und 8,80 μ M und V_{max} von 591 und 627 nmol min⁻¹ mg⁻¹ an Protein für MCoA bzw. GCoA erhalten. Aufgrund des Vorhandenseins beider Carboxylasen in diesen gereinigten Proben konnte von den Autoren keine Aussage getroffen werden, ob die GCase das MCoA als Substrat verwertet.

Aguilar et *al.* (2008) war es somit in ihren Arbeiten möglich, Aktivitäten mit über Avidin-Agarose gereinigten Rohextrakten zu bestimmen. Protein, welches aus Rohextrakt von Zellen, welche mit Leucin als C- und Energiequelle angezogen wurden, zeigte Aktivitäten im Bereich von 425 mU/mg mit MCoA als Substrat. Eine Aktivität mit GCoA konnte dagegen mit dieser Proteinquelle nicht erhalten werden. Vergleichend dazu, konnte mit Protein, gereinigt aus Zellen, welche mit Citronellol als C- und Energiequelle angezogen wurden, Aktivitäten im Bereich von 550 mU/mg mit MCoA und Aktivitäten im Bereich von 600 mU/mg mit GCoA als Substrat erhalten werden.

Warum eine Aktivitätsbestimmung der gereinigten Proteinfraktion mit GCoA in dieser Arbeit nicht erfolgreich war, bleibt unklar. Fest steht, im Gegensatz zur Reaktion mit Geranyl-CoA konnten bei der Verwendung von Methylcrotonyl-CoA als Substrat signifikante Aktivitäten sowohl mit Protein aus Isovaleriansäure-Zellen, als auch mit Protein aus Citronellsäure-Zellen erhalten werden.

Da sich die Reinigung von Wildtypenzym relativ aufwendig gestaltete und dabei immer sehr wenig Protein isoliert werden konnte, aber auch um weitergehende Fragestellungen nach der Aktivität der Geranyl-CoA Carboxylase zu untersuchen, sollte diese und die Methylcrotonyl-CoA Carboxylase des Liu-Weges als His-*Tag* Fusionsproteine rekombinant durch *E. coli* bereitgestellt werden.

5.3. Klonierung von Genen des Atu- und Liu Weges

5.3.1. Klonierung von Einzelgenen

Die Gene *atuE* und *atuA* wurden aus *P. aeruginosa* amplifiziert und unter Verwendung des Vektors pJoe4036.1 in *E. coli* kloniert. Durch die entsprechend abgeleiteten Oligonukleodide war es möglich, die Gene mit der His-*Tag* codierenden Sequenz C-terminal zu fusionieren. Durch *E. coli* JM109 konnten im Folgenden die His-*Tag* Fusionsproteine synthetisiert werden. Die sich anschließende Reinigung der Proteine war über den His-*Tag* mittels

Affinitätschromatographie an Ni-NTA Agarose möglich und auch erfolgreich (Kap.4.5.3. und 4.5.5.). Die Proteine standen für weitere Untersuchungen zur Verfügung. Neben diesen beiden Genen, welche die Funktion der Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase (*atuE*) bzw. möglicherweise die Funktion der 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase (*atuA*) codieren könnten, wurden im Verlauf dieser Arbeit weitere Klonierungen erforderlich.

Auch *atuD*, dessen Genprodukt AtuD später als Citronellyl-CoA Dehydrogenase bestätigt werden konnte (Chattopadhyay, 2007; Förster-Fromme et *al.*, 2008), wurde mit Hilfe des Vektors pJoe4036.1 in *E. coli* JM109 kloniert und als His-*Tag* Fusionsprotein mit einem C-terminalem *Tag* über Ni-NTA Agarose aufgereinigt. Neben diesem Konstrukt erfolgte auch die Herstellung eines pET28a::*atuD* Konstruktes (in Zusammenarbeit mit K. Förster-Fromme), bei welchem das Gen aus *P. aeruginosa* N-terminal mit der codierenden His-*Tag* Sequenz fusioniert vorlag. Für die heterologe Expression des Gens wurde das Konstrukt in den Expressionsstamm *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS RARE transformiert. Auch dieses Protein konnte mit Erfolg in *E. coli* synthetisiert und später über Affinitätschromatographie gereinigt werden (Kap.4.5.1).

Ein weiteres Protein, welches für spätere Untersuchungen benötigt werde würde, stellte LiuE dar. Als Lyase des Liu-Weges (3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Lyase) sollte bei Bereitstellung des Substrates 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA der Lyase des Atu-Weges sowohl das LiuE als auch das AtuA in Hinblick auf die Lyase-Aktivität untersucht werden. Somit wurde auch das Gen *liuE* aus *P. aeruginosa* mittels PCR amplifiziert und mit dem Vektor pJoe4036.1 ligiert. Auch dieses Konstrukt wurde in den Stamm *E. coli* JM109 eingebracht und konnte zur Synthese des rekombinanten Fusionsproteins herangezogen werden. Eine Aufreinigung war in diesem Falle über den C-terminalen His-*Tag* erfolgreich (Kap.4.5.7.).

Die Klonierung der Gene *atuD*, *atuE*, *atuA* und *liuE* war unter der Verwendung des Vektors pJoe4036.1 bzw. pet28a ohne Probleme möglich. Die entsprechenden His-*Tag* Fusionsproteine konnten mit Hilfe des Stammes *E. coli* JM109 bzw. *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS RARE synthetisiert und später in guten Mengen über Affinitätschromatographie aus den entsprechenden löslichen Extrakten aufgereinigt werden. Die Klonierung der Geranyl-CoA und der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase gestaltete sich vergleichend dazu schwieriger.
5.3.2. Klonierung der Carboxylasen

Da mit Hilfe des Vektors pJoe4036.1 erfolgreich die entsprechenden Einzelgene aus *P. aeruginasa* in *E. coli* eingebracht werden konnten und auch die Synthese und spätere Aufreinigung der Fusionsproteine erfolgreich verlief, sollte zunächst auch dieser Vektor für die Klonierung der Geranyl-CoA Carboxylase verwendet werden.

Dabei bestand jedoch der Unterschied, dass sich das Enzym aus zwei Untereinheiten zusammensetzt. Zusätzlich werden die Gene, welche die Untereinheiten der Geranyl-CoA Carboxylase codieren, *atuC* und *atuF* im *atu*-Gencluster durch die Gene *atuD* und *atuE* getrennt. Aufgrund dieser Gegebenheit wurden die Gene zunächst einzeln amplifiziert und im Anschluss über eine gemeinsame Schnittstelle (*XbaI*) als *atuC-atuF* Fragment ligiert (Abb. 5.4). Die verwendeten Oligonukleotide wurden dabei entsprechend so abgeleitet, dass ein Teil der intergenischen Regionen (*atuC-atuD*, *atuE-atuF*) bestehen blieb und eine putative Ribosomenbindestelle *upstream* vom *atuF* (AGGA) über die PCR mit amplifiziert wurde.



Abb. 5.4: Herstellung des Genfragmentes *atuC-atuF* für die Klonierung der GCase

Nach Erhalt des Fragmentes wurde dieses über die äußeren Schnittstellen *NdeI und Bam*HI mit dem Vektor pJoe49036.1 ligiert, wodurch eine C-terminale Fusion mit der His-*Tag* codierenden Sequenz erreicht wurde. Nach Transformation in den Stamm *E. coli* JM109 war die Synthese des rekombinanten Fusionsproteins und eine sich anschließende Reinigung beider Untereinheiten über den C-terminalen *Tag* am AtuF Protein erfolgreich.

Für die Methylcrotonyl-CoA Carboxylase konnten schon mit Enzym, welches aus dem Wildtyp *P. aeruginosa* isoliert wurde, Aktivitäten im Enzymassay bestimmt werden. Um auch eine Kontrolle der Klonierung und des rekombinanten Geranyl-CoA Carboxylase Enzyms in den Händen zu halten, sollte auch die MCase mit Hilfe des Vektors pJoe4036.1 in *E. coli* kloniert werden.

Die beiden Untereinheiten der MCase werden durch die Gene *liuB* und *liuD* codiert, wobei diese im Gencluster durch das Gen *liuC* getrennt werden. Da sich die beiden Gene *liuC* und *liuD* in der Sequenz des Stop- bzw. Startcodons überlappen, wurden die Gene im Gegensatz zu den Genen der Geranyl-CoA Carboxylase zunächst gemeinsam als *liuBCD* Fragment amplifiziert (Abb. 5.5).



Abb. 5.5: Herstellung des Genfragmentes *liuBCD* für die Klonierung der MCase

Nach Erhalt des Fragmentes *liuBCD*, dessen Ligation in den Vektor pJoe4036.1 und die Transformation des Konstruktes in den Stamm *E. coli* JM109 erfolgte auch die Expression der Gene. Nach Auftrennung des Rohextraktes mittels SDS-PAGE konnte lediglich das LiuB im Gel als verstärkte Proteinbande im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Mögliches LiuC bzw. LiuD, als Biotin-haltige Untereinheit der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase, konnten im Gel nicht identifiziert werden. Der Nachweis des Proteins LiuD konnte allerdings mittels Western-Blot Analyse über das enzymgebundene Biotin unter Verwendung des Steptavidin-Antikörper-Konjugates erfolgen. Nichtsdestotrotz war eine gemeinsame Aufreinigung beider MCase Untereinheiten über den C-terminalen His-*Tag* am LiuD erfolgreich (Kap.4.3.2.). Eine intensive Proteinbande in den Waschfraktionen konnte beobachtet werden, wobei es sich dabei der Größe nach um das LiuC Protein handeln könnte. Allerdings war eine Proteinbande entsprechender Größe auch in Waschfraktionen der Aufreinigung der GCase zu identifizieren, was für ein unspezifisches Protein aus dem *E. coli* Rohextrakt sprechen würde. Um eine eindeutige Zuordnung des Proteins LiuC treffen zu können, sind somit spezifische Antikörper gegen dieses Protein erforderlich.

Wurde die Reinigung beider Carboxylasen verglichen, so konnte deutlich mehr MCase Protein als GCase Protein aus *E. coli* isoliert werden. Wurde die Menge an Protein auf 1 g Feuchtgewicht von geernteten *E. coli*-Zellen hochgerechnet, so lag der Gehalt an MCase mit 16 mg um einen Faktor von 8 höher als die gewonnene Menge an rekombinanter GCase mit 2 mg. Mögliche Probleme z.B. durch eine Biotinlimitation wurde durch die Zugabe von zusätzlichem Biotin (1 μ g/ml) begegnet. Auch eine höhere Menge an Biotin im Kulturmedium wurde getestet (5, 10 und 20 fach), resultierte jedoch in keiner signifikanten Verbesserung.

Bekannt war, dass auch in anderen Arbeiten eine Zugabe von Biotin zum Kulturmedium erfolgte (Rodríguez & Gramajo, 1999; Reche et al., 1998; Kanamori et al., 2004), um die Versorgung und den Einbau von Biotin in die entsprechenden rekombinanten Proteine zu gewährleisten. In anderen Fällen erfolgte dagegen die Klonierung des Gens birA (Biotin Ligase Gen) (Rodríguez & Gramajo, 1999; Alves et al., 2011). So wurde z.B. bei Alves et al. (2011) die Biotin Ligase BirA zur Biotinylierung von AccB, dem Biotin Carrier Protein der Acetyl-CoA Carboxylase (ACase) aus Acinetobacter baumannii und Klebsiella pneumonia herangezogen. Zellen, welche AccB-6His und BirA enthielten wurden für den in vitro Einbau von Biotin in Biotin Ligase Puffer (40 mM Natriumphosphat [pH 8.0], 1.5 mM MgCl₂, 5% [v/v] Glycerin, 1 mM DTT, 1 mM D-Biotin) resuspendiert und aufgeschlossen. Nach Zentrifugation und Filtration wurden die erhaltenen Zell-freien Extrakte gemischt und mit ATP (10 mM) versetzt. Der Einbau von Biotin erfolgte unter Schütteln bei 37 °C für 1 Stunde und folgend bei 4 °C über Nacht. Erst das so fertige AccB-6His Protein wurde über Affinitätschromatographie gereinigt und zur Generierung der Acetyl-CoA Carboxylase eingesetzt. Die rekombinanten ACase-Proteinkomplexe beider Organismen konnten im weiteren Verlauf durch die Autoren näher charakterisiert werden. Während über die so durchgeführte in vitro Biotinylierung ein Einbau mit mehr als 90 % erreicht werden konnte, wurde in der Kontrolle (Rohextrakt AccB-6His ohne Inkubation mit BirA) lediglich ein Einbau von 5-15 % bestimmt (Alves et al., 2011). Wie auch immer, jeweils beide Untereinheiten von MCase und GCase wurden in vergleichbaren Mengen (SDS-Gel) in den resultierenden Proteinfraktionen erhalten. Diese Beobachtung wäre in Einklang mit der durch Fall und Hector (1977) postulierten 1:1 Stöchiometrie (A₄B₄-Stöchiometrie).

Während mit den so gewonnenen rekombinanten Enzymen die entsprechenden Assays durchgeführt wurden, musste allerdings festgestellt werden, dass zwar die rekombinante MCase nicht aber die rekombinante GCase Aktivität zeigte.

Um auszuschließen, dass bei der Klonierung des *atuC-atuF* Fragmentes mögliche regulierende DNA-Sequenzen im bestehenden Intergenischen Bereich fehlen, wurde auch eine Klonierung der Gene vergleichend zur MCase durchgeführt. Da die MCase als ganzes Fragment *liuBCD* aus *P. aeruginosa* amplifiziert wurde, erfolgte nun auch die Amplifizierung der GCase Gene als Fragment *atuCDEF* (Abb.5.6).



Abb. 5.6: Herstellung des Genfragmentes atuCDEF für die Klonierung der GCase

Mit den entsprechenden Oligonukleotiden wurde das Fragment unter Einfügen einer NdeI und einer BamHI Schnittstelle vervielfältigt und folgend unter Verwendung des Vektors pJoe4036.1 in E. coli JM109 eingebracht. Mittels des Vektorkonstrukts, in welchem eine Fusion des Gens atuF mit der codierenden His-Tag Sequenz (C-terminal) erfolgte, sollte die Synthese an rekombinantem Protein erfolgen. Die Expression der Gene aus P. aeruginosa in E. coli wurde über die Synthese der Proteine mittels SDS-PAGE kontrolliert. Auch in dem hier mit Coomassie gefärbten Gel konnte lediglich eine verstärkte Proteinbande im Vergleich zur Kontrolle identifiziert werde, welche der Größe nach das AtuC repräsentierte. Sowohl die Biotin-haltige Untereinheit der Geranyl-CoA Carboxylase AtuF, als auch die Proteine AtuD und AtuE konnten nicht aufgrund einer verstärkten Proteinbandenintensität vergleichend zur Kontrolle festgestellt werden. Der Nachweis von AtuF war allerdings über das gebundene Biotin im Western-Blot möglich. Da für die Proteine AtuD und AtuE keine spezifischen Antikörper für einen möglichen Nachweis zur Verfügung standen, kann letztendlich nichts über die Expression der codierenden Gene ausgesagt werden. Da jedoch AtuC mittels SDS-PAGE und AtuF mittels Western-Blot Analyse nachgewiesen werden konnten, ist es unwahrscheinlich, dass eine Expression der Gene *atuD* und *atuE* nicht erfolgte. Ein Nachweis der Proteine über eine Silberfärbung des SDS-Gels schien aufgrund der verwendeten Rohextrakte und dem damit resultierenden starken Hintergrund als ungeeignet. Letzten Endes muss die Herstellung von spezifischen Antikörpern für deren Nachweis in Erwägung gezogen werden. Vergleicht man die Intensität der erhaltenen Signale für AtuC (SDS-PAGE) und AtuF (Western-Blot) so wird deutlich, dass für AtuC deutlich stärkere Signale erhalten wurden (Abb. 4.32). Eine folgende Reinigung des AtuC Proteins über den C-terminalen Tag des AtuF Proteins war in diesem Falle allerdings nicht möglich. Auch die Menge an AtuF selbst, welches vom Ni-NTA Agarose Material der Säule eluierte, war wesentlich geringer als bei vorangegangenen Aufreinigungen (pJoe4036.1::atuCF). Um auszuschließen, dass das Fehlen des AtuC Proteins durch ein Konzentrationsproblem resultierte, wurden die Proteinhaltigen Fraktionen aufkonzentriert und erneut mittels SDS-PAGE kontrolliert. AtuC konnte

jedoch auch in diesen Proben nicht eindeutig festgestellt werden (Abb. 4.31). Daraufhin wurde der Einfluss von veränderten Expressionsbedingungen (Temperatur, Induktions-OD) getestet. Rohextrakte aus diesen Versuchen wurden folgend ebenfalls der Reinigung über Ni-NTA Agarose zugeführt. Eine Reinigung beider Untereinheiten vergleichend zum pJoe4036.1::*atuCF* Konstrukt konnte jedoch sowohl durch veränderte Expressionsbedingungen als auch durch Regeneration des Säulenmaterials nicht erreicht werden. Beide Untereinheiten der Geranyl-CoA Carboxylase konnten in den getesteten Rohextrakten über verschiedene Methoden nachgewiesen werden. Warum eine gemeinsame Reinigung beider nicht möglich war, bleibt unklar. Lediglich die deutlich geringere Menge an AtuF Protein könnte durch die Länge des Genfragmentes (~5260 bp) selbst erklärt werden, aufgrund welcher es eher wahrscheinlich ist, dass RNA-Polymerase Moleküle von der DNA vor dem Erreichen des "Fragment-Endes" abfallen. Dadurch würde die Transkription der Geninformation der "hinteren Gene" in geringerem Maße erfolgen, vergleichend zum viel kürzeren Fragment *atuC-atuF* (~3195 bp).

Da die Probleme der fehlenden Aktivität der GCase (pJoe4036.1::*atuCF*) im Vergleich zur MCase und die nicht erfolgreiche Reinigung der beiden Untereinheiten nach Expression des Konstruktes pJoe4036.1::*atuCDEF* eine Untersuchung des Enzyms unmöglich machten, wurde parallel zu den Arbeiten mit diesem Vektor ein System ausgewählt, welches die Coexpression von mindestens zwei Genen ermöglichen sollte. Das ausgewählte Vektorsystem pCOLA DuetTM-1 der Firma Novagene ist durch das Vorhandensein von zwei Expressionseinheiten, welche jeweils von einem T7*lac*Promotor kontrolliert werden, gekennzeichnet. Beide Expressionseinheiten weisen dabei jeweils eine Ribosomenbindestelle und eine *multi cloning site* (*mcs*) auf, welche die Klonierung von zwei Genen und somit deren Coexpression in *E. coli* ermöglichen soll. Für eine spätere Reinigung der rekombinanten Proteine stehen sowohl ein N-terminaler His-*Tag* (*mcs1*) als auch ein C-terminaler Strep-*Tag* (*mcs2*) zur Verfügung.

Beim Konstrukt pJoe4036.1::*atuCF* konnte ein mögliches Stören der Aktivität der Geranyl-CoA Carboxylase durch einen Einfluss des C-terminalen His-*Tags* am AtuF noch nicht ausgeschlossen werden. Aus diesem Grunde wurde im Falle des Vektorsystems pCOLA DuetTM-1 das *atuC* mit der N-terminalen His-*Tag* codierenden Sequenz der *mcs*1 fusioniert. Das Gen *atuF* wurde dagegen in die *mcs*2 kloniert, ohne das später ein Strep-*Tag* am Protein resultierte. Infolgedessen standen sowohl die Konstrukte pCOLA::*atuC* und pCOLA::*atuCF*, als auch das Konstrukt pCOLA::*atuF* als mögliche Kontrolle zur Verfügung. Auch bei diesen Konstrukten wurde zunächst die Expression der Gene (in E. coli Rosetta2 (DE3) pLysS RARE) über die entsprechend resultierenden Proteine kontrolliert. Im SDS Gel konnten dabei deutlich stärkere Proteinbanden im Vergleich zur Kontrolle identifiziert werden. Das Protein AtuF, welches hier nicht mittels Tag markiert vorlag, konnte dabei deutlich in den Rohextrakten von Zellen identifiziert werden, welche die Konstrukte pCOLA::atuF und pCOLA::atuCF enthielten. Die Stärke der Proteinbande, welcher AtuC zugeordnet werden konnte, war vergleichend dazu deutlich geringer. Diese Bande konnte in den Proben mit den Konstrukten pCOLA::atuC und pCOLA::atuCF beobachtet werden, wobei auffiel, dass die AtuC Bande im letzteren Fall eine noch etwas schwächere Intensität zeigte. Noch merkwürdiger war allerdings, dass in der Probe von Zellen mit dem Konstrukt pCOLA::atuF eine Proteinbande vergleichbarer Größe zum AtuC identifiziert werden konnte (Abb. 4.38/4.39). Mittels Western-Blot Analyse und Antikörper gegen den His-Tag konnte jedoch gezeigt werden, dass das AtuC lediglich in Proben mit den Konstrukten pCOLA::atuC und pCOLA::atuCF nachweisbar war. Western-Blot Analysen der Proben mit Streptavidin Antikörper Konjugat zum Nachweis der Biotin-haltigen Untereinheiten bestätigten dagegen das Vorhandensein des AtuF Proteins lediglich in Proben mit den entsprechenden Konstrukten (pCOLA::atuF, pCOLA::atuCF). Dabei war die Intensität dieser Signale deutlich stärker als die Signale, welche in den entsprechenden Proben mit den pJoe4036.1 Konstrukten für LiuB und AtuF erhalten wurden. Die Expression des Gens atuF im pCOLA Duet¹-1 bzw. die Synthese des daraus resultierenden Proteins ohne Tag scheint damit deutlich besser zu erfolgen, als in Proben in denen das Gen mit den His-Tag codierenden Sequenzen fusioniert vorliegt. Somit kann vermutet werden, dass der C-terminale Tag einen Einfluss auf die Expression und/oder auf die Synthese des rekombinanten Proteins besitzt. Aufgrund fehlender Antikörper gegen das AtuC können für dieses Protein lediglich die erhaltenen Signale im SDS-Gel miteinander verglichen werden. Vergleichbar waren in diesem Falle die Signale, welche für die Proben der Rohextrakte von Zellen mit den Konstrukten pJoe4036.1::atuCF und pCOLA::atuC erhalten wurden. Scheinbar etwas geringere Intensitäten lieferten dagegen die Proben der Stämme mit den Konstrukte pJoe4036.1::atuCDEF und pCOLA::atuCF, wobei ein Vergleich der Signale der Proben pCOLA::atuC und pCOLA::atuCF im Western-Blot mit His-Tag Antikörpern dies nicht unbedingt bestätigte. Nichtsdestotrotz muss an dieser Stelle angemerkt werden, dass bei der Analyse der pCOLA-Proben sowohl mit dem Streptavidin Antikörper Konjugat als auch mit den Antikörpern gegen den His-Tag diverse zusätzliche Signale erhalten werden konnten, mit Ausnahme in den entsprechenden Kontrollen.

Trotz des Nachweises der Untereinheiten der Geranyl-CoA Carboxylase in den Rohextrakten der verschiedenen Proben war es im folgenden Verlauf der Arbeit nicht möglich, die beide Untereinheiten über den N-terminalen His-*Tag* am AtuC aus dem Rohextrakt von *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS RARE) pCOLA::*atuCF* aufzureinigen (Abb. 4.41). Während im Größenbereich von AtuC kein Protein festgestellt werden konnte, traten im 25 kDa Bereich zwei deutliche und im 75 kDa Bereich zwei sehr schwache Proteinbanden in Erscheinung. Eine weiterführende Untersuchung dieser Proteinbanden erfolgte im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr. Allerdings wurde getestet, ob durch das Mischen der Rohextrakte und somit die Inkubation von AtuC (pCOLA::*atuC*) und AtuF (pCOLA::*atuF*) eine Verbesserung des Aufreinigungsprotokolls erreicht werden könnte. Jedoch war es unter diesen Bedingungen nicht möglich ein "Zusammenfinden" der Untereinheiten zu erreichen. Die Aufreinigung des Proteinkomplexes war auch auf diesem Wege nicht möglich (Abb. 4.43).

Unter Verwendung des Vektorsystems pCOLA Duet^M-1 und den hier gewählten Bedingungen war zwar eine Synthese der rekombinanten Proteinuntereinheiten der Geranyl-CoA Carboxylase aus *P. aeruginosa* in *E. coli* möglich, allerdings war die gemeinsame Aufreinigung dieser über den am AtuC angefügten N-terminalen His-*Tag* über Ni-NTA Agarose nicht erfolgreich.

Im Gegensatz zu den Arbeiten zu dieser Dissertation gelang es Aguilar et *al.* (2008) beide Carboxylasen (Geranyl-CoA und Methylcrotonyl-CoA Carboxylase) erfolgreich zu klonieren und mit den aufgereinigten Proteinen Enzymkinetiken zu bestimmen. Die Wissenschaftler amplifizierten die Gene *liuB*, *liuC*, *atuC* und *atuF* zunächst einzeln aus *P. aeruginosa* und klonierten diese im Anschluss in den Vektor pGem-T Easy, wodurch die Plasmide pG*liuB*, pG*liuD*, pG*atuC* und pG*atuF* resultierten. Diese wurden wiederum einem Doppelverdau unterzogen und die Genfragmente *liuB*, *liuC* und *atuC* in das pTrcHis2A und *atuF* in das pTrcHis2C Plasmid kloniert, sodass pTrc-*liuB*, pTrc-*liuD*, pTrc-*atuC* und pTrc-*atuF* erhalten wurden. Die Gene wurden also zunächst einzeln kloniert und in *E. coli* überexprimiert. Mit Hilfe eines N-terminalen His-*Tags* der rekombinanten Proteine erfolgte dann eine Reinigung. Zusätzlich wurden die Gene der Geranyl-CoA Carboxylase in den Coexpressionsvektor pCDFDuet-1 kloniert, sodass das Konstrukt pCFC3-*atuFC* gewonnen wurde. Durch dieses resultierten die Proteine AtuC mit einem N-terminalen His-*Tag* und AtuF mit einem C-terminalen *Strep-Tag*.

Mit Hilfe der aufgereinigten rekombinanten Untereinheiten der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase LiuB-His und LiuD-His konnten zunächst keine Enzymaktivitäten bestimmt werden, wobei aktives Enzym auch nicht durch unterschiedlichste Renaturierungsbedingungen bereitgestellt werden konnten. Im Gegensatz zu den Proteinen, welche in dieser Arbeit über Coelution von der Ni-NTA Agarose über den C-terminalen His-Tag am Protein LiuD gemeinsam aufgereinigt wurden und im Anschluss auch eine MCase Aktivität zeigten, konnte die Aktivität bei Aguilar et al. (2008) erst durch Mischen der gereinigten α - und β -Untereinheiten, Denaturierung und folgender Renaturierung über Dialyse unter Verwendung einer Spectrum *10-kDa-molecular-mass-cutoff* Membran (Fisher Scientific) und Kaliumhydrogenphosphat-Puffer mit Glycerol und DTT erhalten werden. Allerdings konnte auf diese Weise keine Aktivität der Proteine AtuC-His und AtuF-His als Geranyl-CoA Carboxylase erreicht werden. Ein funktionelles GCase Enzym wurde dagegen von Aguilar et al. (2008) erhalten, indem die Gene der Proteinuntereinheiten gemeinsam im Vektor pCFC3atuFC coexprimiert und folgend aufgereinigt wurden. Dabei zeigte sich, dass über eine Bindung des AtuF-Strep Proteins an AtuC-His die gemeinsame Reinigung über den His-Tag möglich war. Solch eine gemeinsame Reinigung aufgrund einer Protein-Protein Interaktion war schon aus früheren Arbeiten bekannt. So zeigten z.B. die Acyl-CoA Carboxylasen von Streptomyces coelicolor A3(2) (Diacovich et al., 2002) und die Acetyl-CoA Carboxylase von Corynebacterium glutamicum (Gande et al., 2007) ein ähnliches Verhalten. Die Acetyl-CoA (ACase) und die Propionyl-CoA Carboxylase (PCase) aus Streptomyces coelicolor A3(2) setzen sich aus jeweils drei Untereinheiten zusammen, wobei die α-Untereinheit AccA2 in beiden vertreten ist. Bei der β - bzw. der ϵ -Untereinheit handelt es sich im Falle der ACase um AccB bzw. AccE und im Falle der PCase um PccB bzw. PccE. Bei der Untersuchung der Interaktion zwischen AccE und PccE mit ihren korrespondierenden Carboxyltransferasen AccB und PccB kamen auch *copurification* Experimente zum Einsatz, bei welchen jeweils eine der beiden Untereinheiten mit einem N-terminalen His-Tag ausgestattet wurde. Es zeigte sich in diesem Falle, dass die Reinigung von AccE über His-AccB und von PccB über His-PccE möglich war und somit stabile Komplexe ausgebildet wurden (Diacovich et al., 2002). Bei der Untersuchung der Acetyl-CoA Carboxylase von Corynebacterium glutamicum, welche sich aus AccBC (α-UE), AccD1 (β-UE) und AccE (ε-UE) zusammensetzt, konnten ähnliche Ergebnisse erzielt werden, wobei AccBC über das His-AccD1 und AccE über AccD1-AccBC isoliert werden konnten (Gande et al., 2007). Diese Ergebnisse der gemeinsamen Reinigung über eine Tag-tragende Untereinheit konnten auch schon in dieser Arbeit mit den Konstrukten pJoe4036.1::liuBCD und pJoe4036.1::atuCF gezeigt werden, wobei jedoch zwar die resultierende MCase nicht aber die GCase Aktivitäten hervorbrachte. Nichtsdestotrotz, eine gemeinsame Reinigung der GCase Untereinheiten nach einer Coexpression vergleichend zu Aguilar et *al.* (2008) war in dieser Arbeit nicht erfolgreich. Eine Charakterisierung der rekombinanten Geranyl-CoA Carboxylase war somit lediglich durch die Arbeitsgruppe um Campos-García möglich.

Die Acetyl-CoA Carboxylase katalysiert den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt bei der Fettsäuresynthese (Alberts & Vagelos, 1972). In *E. coli* handelt es sich um einen Proteinkomplex, welcher zwei verschiedene Reaktionen katalysiert (Alberts & Vagelos, 1972; Guchhait et *al.*, 1974). Die Biotin Carboxylase (BC) katalysiert die Carboxylierung von Protein-gebundenem Biotin mit Bicarbonat und folgender Übertragung der Carboxylgruppe vom Carboxybiotin auf Acetyl-CoA unter Bildung von Malonyl-CoA, wobei der letztere Schritt durch die Carboxyltransferase (CT) katalysiert wird (Alberts & Vagelos, 1972; Polakis et *al.*, 1974). Eine dritte Untereinheit, das Biotin-Carboxyl-Carrier Protein (BCCP), trägt als prosthetische Gruppe Biotin, welches kovalent an einem Lysin-Rest nahe des C-terminus gebunden ist (Abb. 5.7, Sutton et *al.*, 1977).



Abb. 5.7: Reaktionsschema zur Funktionsweise der Acetyl-CoA Carboxylase nach Sutton et *al.*, 1977, welche aus Acetyl-CoA Malonyl-CoA generiert

Obwohl sich die Reaktionsprodukte der verschiedenen Biotin Enzyme unterscheiden, handelt es sich doch um Reaktionen, die nach einem ähnlichen Zwei-Schritt-Mechanismus ablaufen (Samols et *al.*, 1988; Knowles, 1989). Alle eukaryotischen und die meisten bakteriellen Enzyme nutzen Bicarbonat und ATP um das Carboxybiotin zu generieren. Mögliche Carboxyl-Akzeptoren sind Acyl-CoAs (z.B. Propionyl-CoA, Acetyl-CoA, β -Methylcrotonyl-CoA, Geranyl-CoA) oder Carbonsäuren wie Pyruvat und Harnstoff (Wood & Barden, 1977; Knowles, 1989).

$E-Biotin + ATP + HCO_3^- \rightleftharpoons$		E -Biotin- CO_2^- + ADP + P_i	
E-Biotin-CO ₂ -+R-H		E-Biotin + R-CO ₂ -	
$R-H + ATP + HCO_3^-$		$R-CO_2 + ADP + P_i$	

Schema 5.1: Allgemeine Reaktion der Acyl-CoA Carboxylasen (Biotin Enzyme Klasse I) nach Samols et *al.*, 1988

Eine zweite Klasse von Biotin Enzymen wirken als Energieumwandler in anaeroben Bakterien, wobei die Decarboxylierung mit einer Natrium-Pumpe gekoppelt ist und somit Natrium entgegen des Konzentrationsgefälles transportiert wird. Entsprechende Enzyme, die eine solche Reaktion katalysieren, sind Oxalacetat Decarboxylase, Methylmalonyl-CoA Decarboxylase und Glutaconyl-CoA Decarboxylase (Dimroth, 1987; Samols et *al.*, 1988; Knowles, 1989).

$$R-CO_{2}^{-} + E-Biotin \qquad \longleftrightarrow \qquad R-H + E-Biotin-CO_{2}^{-}$$

$$E-Biotin-CO_{2}^{-} + H^{+} + 2(Na^{+})_{in} \iff E-Biotin + HCO_{3}^{-} + 2(Na^{+})_{out}$$

$$R-CO_{2}^{-} + + H^{+} + 2(Na^{+})_{in} \iff R-H + HCO_{3}^{-} + 2(Na^{+})_{out}$$

Schema 5.2: Allgemeine Reaktion Biotin Enzyme Klasse II nach Samols et al., 1988

Die dritte Klasse stellt die Transcarboxylase aus *Propionibacterium shermanii* dar, welche die Carboxylübertragung zwischen Carbonsäure und Acyl-CoA ohne ATP und Bicarbonat katalysiert.

CH ₃ CH(COO ⁻)COSCoA + B	liotin \implies	CH ₃ CH ₂ COSCoA+	Biotin-CO ₂ -
Biotin-CO ₂ ⁻ + CH ₃ COCOO ⁻		Biotin + -OOCCH ₂ C	0000-
CH ₃ CH(COO ⁻)COSCoA + C Methylmalonyl-CoA	H₃COCOO- ←→ Pyruvat	CH ₃ CH ₂ COSCoA + Propionyl-CoA	-OOCCH ₂ COCOO- Oxalacetat

Schema 5.3: Allgemeine Reaktion Biotin Enzyme Klasse III nach Samols et al., 1988

Die Acetyl-CoA Carboxylase stellt ein Biotin-abhängiges Enzym dar, dessen Struktur zwischen den einzelnen Arten recht verschieden ist. In vielen Bakterien sind die drei Komponenten Biotin-Carboxylase (BC), Biotin-Carboxyl-Carrier Protein (BCCP) und Carboxyltransferase (CT), welche die Reaktion in Abb. 5.7 katalysieren, einzelne, von unterschiedlichen Genen kodierte Proteine, während das entsprechende Enzym in Wirbeltieren und Hefen ein durch ein einzelnes Gen kodiertes multifunktionales Polypetptid darstellt (Lopez-Casillas et *al.*, 1988; Al-Feel et *al.*, 1992; Li & Cronan, 1992a, b).

Überwiegend sind Arbeiten bekannt, in denen die Gene, welche für Biotin-haltige Proteine codieren, ihre Struktur bzw. die Aktivität der entsprechenden Genprodukte näher untersucht wurden (Schiele et *al.*, 1975; Kondo et *al.*, 1991; Baldet et *al.*, 1992; Li & Cronan, 1992 a, b; Best & Knauf, 1993; Huder & Dimroth, 1993; Song et *al.*, 1994; Marini et *al.*, 1995; Bott et *al.*, 1997; Kimura et *al.*, 2000; Dunn et *al.*, 2001; Che et *al.*, 2003; Segura & Espin, 2004). Später wurden auch rekombinante Proteine synthetisiert, wobei jedoch lediglich einzelne Gene der diversen Biotin Enzyme aus den Wildtypstämmen amplifiziert und rekombinant exprimiert wurden (Reche et *al.*, 1989; Nakamura et *al.*, 1995; Braune et *al.*, 1999; Rodríguez & Gramajo, 1999; Rodríguez et *al.*, 2001; Diacovich et *al.*, 2002; Kumar Bhat & Berger, 2007; Daniel et *al.*, 2007). Die Klonierung der Gene der Carboxyltransferase der Acetyl-CoA Carboxylase (Abb. 5.8) stellte die Wissenschaftler in einer aktuelleren Arbeit jedoch vor ein Problem. Die Carboxyltransferase Domäne der Acetyl-CoA Carboxylase wird durch die Gene *accA* und *accD* codiert. Diese Gene liegen jedoch im Genom von *P. aeruginosa* und anderen Bakterien nicht in naher Nachbarschaft (Best & Knauf, 1993).



Abb. 5.8: Reaktion der bakteriellen Acetyl-CoA Carboxylase und daran beiteiligte Proteine nach Alves et *al.*, 2011

Für die Klonierung und die Expression der Gene und damit die Generierung des Enzyms Acetyl-CoA Carboxylase aus *Acinetobacter baumannii* und *Klebsiella pneumoniae* durch Alves et *al.* (2011) wurde daher ein bicistronischer AccA/AccD Coexpressionsvektor generiert, welcher die Expression der Gene und die Reinigung des AccAD Komplexes über einen His-*Tag* ermöglichen sollte. Eine ähnliche Strategie konnte dabei schon bei der Expression der Acetyl-CoA Carboxylase Carboxyltransferase Domäne und der Aspartat Transcarbamylase aus *E. coli* erfolgreich umgesetzt werden (Blanchard & Waldrop, 1998;

Yang & Schachman, 1993). Für die Bereitstellung des entsprechenden Coexpressionsvektors wurden die Gene accA und accD zunächst einzeln kloniert. Die Fusion der Sequenz wurde folgend in einer zweiten PCR-Reaktion erhalten, wobei eine intercistronische Region von 12 bp, eine Ribosomen-Bindestelle enthaltend, zwischen den beiden Genen accA und accD mit amplifiziert wurde. Durch Klonierung des Fragmentes, bzw. der Fragmente accC und accB in den Vektor pET28a+ und das Einbringen der Konstrukte in den Stamm E. coli BL21(DE3) war eine Expression und folgende Aufreinigung des Komplexes und der Einzelproteine möglich. Da die AccB Untereinheit für ihre katalytische Aktivität Biotin benötigt (Soriano et al., 2006), wurde von den Autoren auch das Gen birA (Biotin Ligase Gen) aus den Organismen Acinetobacter baumannii und Klebsiella pneumoniae kloniert und folgend über den Vektor pET42b ohne Tag in E. coli überexprimiert. Die Biotin Ligase BirA wurde für die in vitro Biotinylierung von AccB, dem Biotin-Carrier Protein, eingesetzt. Das mit Biotin beladene AccB Protein wurde im Anschluss daran, wie die übrigen Komponenten des Acetyl-CoA Carboxylase Komplexes über Affinitätschromatographie gereinigt und der Enzymkomplex in vitro generiert, wobei beide rekombinanten Enzyme im weiteren Verlauf durch die Autoren näher charakterisiert werden konnten (Alves et al., 2011).

Diese Strategie ist vergleichbar mit der in dieser Arbeit gewählten zur gemeinsamen Klonierung von atuC und atuF aus P. aeruginosa PAO1 als Untereinheiten der Geranyl-CoA Carboxylase. Bei dem Konstrukt hier (pJoe4036.1::atuCF) wurden die Gene zunächst einzeln amplifiziert, wobei ein Teil der intergenischen Region, eine putative Ribosomenbindestelle aufweisend mit eingeschlossen wurde. Allerdings konnte zwar die rekombinante Geranyl-CoA Carboxylase (beide Untereinheiten) erhalten werden, eine Aktivität dieser mit dem Substrat Geranyl-CoA war jedoch nicht zu bestimmen. Dagegen zeigte die entsprechend erhaltende Methylcrotonyl-CoA Carboxylase (pJoe4036.1::liuBCD) eine deutliche Aktivität mit Methylcrotonyl-CoA als Substrat. Warum keine Aktivität der GCase erhalten werden konnte, bleibt in dieser Arbeit unklar. Fest steht, die in vivo Biotinylierung der MCase war anscheinend durch Zugabe von Biotin zum Kulturmedium ausreichend gewährleistet. Ob eine fehlende GCase Aktivität auf eine unzureichende Biotin-Versorgung zurückgeführt werden kann, ist auf Grund der MCase Aktivität unwahrscheinlich, kann jedoch aber auch nicht ausgeschlossen werden. Dieser Aspekt kann nur in folgenden Arbeiten durch die Expression des Biotin Ligase Gens und einer entsprechenden Biotinylierung in vitro überprüft werden (vgl. zu Rodríguez et *al.*, 2001; Alves et *al.*, 2011).

5.4. Aktivität der rekombinanten Enzyme aus E. coli

5.4.1. Citronellyl-CoA Dehydrogenase - AtuD

Die Funktion des *atuD* Genproduktes wurde aufgrund von Ähnlichkeiten zu Proteinen bekannter Funktion als Acyl-CoA Dehydrogenase angenommen (Höschle et *al.*, 2005; Förster-Fromme et *al.*, 2006; Förster-Fromme & Jendrossek, 2006). Erste experimentelle Arbeiten erfolgten durch Chattopadhyay (2007). In dieser Arbeit wurde das Gen *atuD* aus *P. aeruginosa* kloniert und mit Hilfe des Vektors pJoe4036.1 ohne *Tag* in *E. coli* eingebracht. Mit den erhaltenen Rohextrakten, welche das rekombinante Protein enthielten, wurden erste Untersuchungen zur Dehydrogenaseaktivität unternommen und ein entsprechender Enzymassay etabliert. Folgend wurden in der Arbeit von Förster-Fromme et *al.* (2008) und der vorliegenden Arbeit Vektorkonstrukte hergestellt, in welchen das *atuD* mit den codierenden Sequenzen eines His-*Tags* fusioniert wurde. Somit standen mit dem pJoe4036.1::*atuD* das Genprodukt mit einem C-terminalen und mit pET28a::*atuD* das Genprodukt mit einem N-terminalen His-*Tag* zur Verfügung.

In dieser Arbeit konnte die Reaktion des AtuD Proteins auch mittels HPLC-(ESI)-MS Analyse bestätigt werden, in welchen die Abnahme von Citronellyl-CoA und eine Zunahme von Geranyl-CoA im Ansatz bestimmt wurde. Bei den Untersuchungen mittels Enzymassay zeigte AtuD eine spezifische Aktivität mit Citronellyl-CoA. Im Weiteren war es möglich, durch Zugabe von zusätzlichen FAD zum Enzymansatz eine Steigerung der Aktivität zu erreichen. Diese Steigerung der Aktivität war in den Untersuchungen von Förster-Fromme (2008) nicht zu beobachten. Trotz gelber Farbe der gereinigten Proteinlösung, welche das Vorhandensein von FAD als gebundenen Cofaktor anzeigte, war der Einbau in jedes Molekül AtuD somit scheinbar nicht vollständig. Im Gegensatz zu der Arbeit von Förster-Fromme (2008) reichte die Zugabe von Riboflavin zum Kulturmedium für die Herstellung des FADs nicht aus. Für weiterführende Untersuchungen müsste somit die Konzentration an zugesetztem Riboflavin für die Bereitstellung des benötigten Cofaktors erhöht werden. Warum in einem Fall die Versorgung ausreichend war und in einem anderen Fall zusätzliches FAD zum Assay zugesetzt werden musste, könnte in der Konzentration des erhaltenen, rekombinanten Proteins begründet sein. Möglich ist, dass in einer Expressionskultur mehr Protein AtuD durch *E. coli* synthetisiert wurde, und somit die Menge an Riboflavin (1 µg/ml) im Kulturmedium nicht mehr ausreichend war, um den entsprechenden Cofaktor FAD zu generieren. Diese Beobachtung konnte bei Förster-Fromme (2008) auch für das rekombinante

LiuA, die FAD-abhängige Isovaleryl-CoA Dehydrogenase des Liu-Weges, gemacht werden. Hier zeigte sich, dass das *liuA* sehr viel stärker als das *atuD* exprimiert wurde und somit *E. coli* deutlich mehr rekombinantes LiuA Protein lieferte. Die Versorgung mit Riboflavin im Kulturmedium war auch in diesem Falle nicht ausreichend, konnte jedoch doch Zugabe von zusätzlichem FAD zu den Enzymtestansätzen erreicht werden. Die Charakterisierung der FAD-abhängigen Acyl-CoA Dehydrogenasen des Atu- und des Liu-Weges AtuD und LiuA erfolgte schließlich in den Arbeiten von Förster-Fromme et *al.* (2008) bzw. Förster-Fromme & Jendrossek (2008).

5.4.2. Geranyl-CoA Carboxylase – AtuC/AtuF & Methylcrotonyl-CoA Carboxylase – LiuB/LiuC

Die rekombinanten Proteine Geranyl-CoA Carboxylase und Methylcrotonyl-CoA Carboxylase, wurden heterolog in *E. coli* synthetisiert und folgend über Ni-NTA Agarose aufgereinigt. Unter Verwendung des Konstruktes pJoe4036.1::*atuCF*, welches die Untereinheiten der Geranyl-CoA Carboxylase und des Konstruktes pJoe4036.1::*liuBCD*, welches die Untereinheiten der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase lieferte, waren Enzymuntersuchungen möglich.

Bei der Untersuchung der rekombinanten MCase, welche aus dem Konstrukt pJoe4036.1::liuBCD resultierte, konnten dabei vergleichbare Aktivitäten (5300 mU/mg) wie bei der Verwendung von partiell gereinigtem Wildtypenzym erhalten werden. Auch ein möglicher Einfluss von Reduktionsmitteln wie DTT und Glutathion zur Stabilisierung des Enzyms wurde getestet, wobei durch Einsatz dieser die Stabilität der Proteinlösung über längere Zeit erhalten werden konnte. Um die Vergleichbarkeit der einzelnen Messungen in der vorliegenden Arbeit jedoch zu gewährleisten, wurde auf die Zugabe von DTT bzw. Glutathion verzichtet und die Proteine zeitnah nach ihrer Aufreinigung auf Aktivität hin getestet. In folgenden Arbeiten sollte die Zugabe von DTT jedoch schon bei der Aufreinigung der entsprechenden Proteine vergleichend zu Seubert et al. (1963) und Hector & Fall (1976b; Fall & Hector, 1977) erfolgen, um gegebenenfalls Probleme mit der Aktivität (vgl. Geranyl-CoA Carboxylase) ausschließen zu können. Des Weiteren könnten Zusätze wie Glycerin, EDTA, Inositol und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) getestet werden. So wurden z.B. in anderen Arbeiten neben DTT auch Glycerin (Alban et al., 1993; Chen et al., 1993; Bott et al., 1997; Rodríguez et al., 2001), Glycerin und EDTA (Alban et al., 1993; Guan et al. 1999; Diacovich et al., 2002) bzw. Inositol (Mukhopadhyay et al., 1998) den verwendeten Puffern zugesetzt. In wieder anderen Arbeiten wurde Puffer mit PMSF verwendet, um einen unerwünschten Proteinabbau durch im Lysat befindliche Proteasen zu verhindern (Braune et *al.*, 1999; Rodríguez & Gramajo, 1999; Rodríguez et *al.*, 2001; Daniel et *al.*, 2007). Bei Daniel et *al.* (2007) und Alves et *al.* (2011) erfolgte des weiteren die Lagerung der gereinigten Proteine bei 4 °C in Puffern, welche 10 % Glycerin enthielten.

Während mit gereinigten *P. aeruginosa* Rohextrakten (Isovaleriansäure und Citronellsäure Zellen) MCase Aktivitäten bestimmt werden konnten, war dies für die GCase nicht möglich. Im Falle der rekombinanten Geranyl-CoA Carboxylase aus *E. coli*, welche mit Hilfe des Konstruktes pJoe4036.1::*atuCF* erhalten und gereinigt werden konnte, waren ebenfalls im Vergleich zur rekombinanten MCase keine signifikanten Aktivitäten zu bestimmen. Ein möglicher Einfluss der Biotinylierung wurde bereits im Abschnitt 5.3. besprochen. Um einer möglichen Unterversorgung entgegen zu wirken, wurden Enzymansätze mit zusätzlichem Biotin vergleichend zum LiuA-Assay (mit zusätzlichem FAD) getestet. Allerdings konnten in diesen Versuchen keine Aktivitäten erhalten werden. Da eine Biotinylierung der GCase Untereinheit AtuF in dieser Arbeit nicht kontrolliert wurde, kann dennoch nicht ausgeschlossen werden, dass ein Mangel an Biotin ein Grund für die fehlende Aktivität darstellen könnte.

Auch ein mögliches Ziehen der Reaktion in die Produkt-Richtung (Isohexenyl-glutaconyl-CoAs) bzw. die mögliche Stabilisierung des Produktes der Reaktion durch die nachfolgenden Enzyme wurde getestet. Hierfür wurde der Carboxylase-Assay mit Zusatz der drei rekombinanten Enzyme Geranyl-CoA Carboxylase, Isohexenylglutaconyl-CoA Hydratase (AtuE) und die 3-Hydroxy-3-isohexenylglutaryl-CoA:Acetat Lyase (AtuA?) durchgeführt. Ein Einfluss der letzteren beiden Proteine auf die Aktivität der GCase konnte jedoch nicht gezeigt werden, da eine Aktivität auch bei diesen Reaktionen nicht beobachtet werden konnte. Aufgrund der fehlenden Aktivität der Geranyl-CoA Carboxylase können dieser Einfluss und das Wirken der Enzyme als Komplex mit einer möglichen Stabilisierung der Zwischenprodukte allerdings aber nicht ausgeschlossen werden. Auch wenn die Möglichkeit besteht, dass die rekombinanten Proteine aus E. coli aufgrund einer zum Wildtyp verschiedenen Faltung oder einem "fehlerhaftem" Zusammenbau der einzelnen Untereinheiten im Falle der Geranyl-CoA Carboxylase nicht aktiv sind, so ist die Wahrscheinlichkeit aufgrund einer Citronellyl-CoA und Isovaleryl-CoA Dehydrogenase bzw. einer aktiven aktiven Methylcrotonyl-CoA Carboxylase doch gering. Nichtsdestotrotz auch durch die Zugabe von P. aeruginosa Rohextrakt konnte die Reaktion nicht in die gewünschte Richtung gezogen werden.

Neben dem Konstrukt pJoe4036.1::*atuCF* stand auch das Konstrukt pJoe4036.1::*atuCDEF*, bei welchem die Klonierung entsprechend dem pJoe4036.1::*liuBCD* Konstrukt erfolgte zur Verfügung. In diesem Falle konnte das AtuC Protein allerdings nicht mehr über das AtuF, welches als His-*Tag* Fusionsprotein vorlag, mit aufgereinigt werden. Im Vergleich zum AtuF konnte AtuC hier nur in Spuren im SDS-Gel beobachtet werden. Die so gewonnene Probe zeigte dementsprechend auch keine Aktivitäten mit Geranyl-CoA bzw. Methylcrotonyl-CoA.

Die Klonierung von Genen, welche in einem Operon strukturiert sind, erfolgte schon in diversen Arbeiten. Dabei sollte zum einen die Strukturanordnung der Gene bzw. die Funktion der Genprodukte geklärt und zum anderen die Eigenschaft bestimmte Metabolite zu produzieren auf einen anderen Organismus übertragen werden (Tao et al, 1993; McGowan et al., 1996; Ishii et al., 2000; Tang et al., 2000; Kuhlmann & Bremer, 2002; Velasco et al., 2005; Ma et al., 2009; Dueholm et al., 2010; Simeonova et al., 2010; Wang et al., 2010). So weit bekannt, gibt es dagegen keine Untersuchungen, bei denen mehrere Gene eines Operons amplifiziert, kloniert und heterolog exprimiert wurden. Die Gene des Atu-Weges liegen strukturiert in einem Operon vor, wobei die Strukturgene atuA, atuB, atuC, atuD, atuE, atuF, atuG und atuH nach Induktion durch Wachstum auf azyklischen Monoterpenen vermutlich gemeinsam abgelesen und exprimiert werden. Die Gensequenz atuCDEF wurde aus dem Wildtyp P. aeruginosa Gencluster atuRABCDEFGH als Ganzes mittels PCR amplifizert und unter die Kontrolle des Promotors des Vektors pJoe4036.1 gestellt. Auch wenn die Genprodukte AtuC (SDS-PAGE) und AtuF (Western-Blot) in E. coli produziert wurden, so bleibt doch unklar, warum in diesem Falle keine gemeinsame Reinigung über das His-Tagtragende AtuF möglich war.

Demgegenüber war die Reinigung der durch Expression in *E. coli* (pJoe4036.1::*liuBCD*) erhaltenen Genprodukte LiuB und LiuD über den His-*Tag* am LiuD erfolgreich und es konnte ein aktives Enzym bestehend aus beiden Untereinheiten erhalten werden. Nichtsdestotrotz war das LiuC, vergleichend zu AtuD und AtuE, welche aus dem Konstrukt pJoe4036.1::*atuCDEF* in *E. coli* resultieren mittels SDS-PAGE nicht nachweisbar. Für diese Proteine ist die Produktion von spezifischen Antikörpern erforderlich, um auch ihre Anwesenheit im *E. coli* Rohextrakt nachzuweisen.

Im Gegensatz zu den Versuchen in dieser Arbeit konnte durch Aguilar et *al.* (2008) auch eine aktive Geranyl-CoA Carboxylase aus *P. aeruginosa* in *E. coli* synthetisiert werden. Diese und das entsprechende MCase Enzym wurde folgend von den Wissenschaftlern näher charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass der optimale pH bzw. die optimale Temperatur sowohl bei der rekombinanten MCase als auch bei der rekombinanten GCase bei 8,5 bzw. 37 °C liegt.

Diese Werte konnten auch für die Wildtypenzyme aus *P. aeruginosa* erhalten werden (Aguilar et *al.*, 2008) und waren ähnlich denen, welche für die MCase aus Säugern (Lau et *al.*, 1980), Bakterien (Schiele & Lynen, 1981) und Pflanzen (Baldet et *al.*, 1992; Alban et *al.*, 1993; Chen et *al.*, 1993; Diez et *al.*, 1994) berichtet wurden. Während die MCase aus Blättern der Erbsen und Mitochondrien der Kartoffel auch stabil bei Temperaturen über 50 °C sind (Alban et *al.*, 1993), werden MCase und GCase aus *P. aeruginosa* (Aguilar et *al.*, 2008), wie auch die MCase aus *P. citronellolis* bei diesen Temperaturen inaktiviert (Hector & Fall, 1976b).

Die rekombinante, über Coexpression erhaltene, Geranyl-CoA Carboxylase zeigte sowohl GCase als auch MCase Aktivität, wobei mit GCoA als Substrat eine sigmoidale Kinetik und mit MCoA eine Michaelis-Menten Kinetik beobachtet werden konnte. Als kinetische Konstanten erhielten die Wissenschaftler $K_{0.5}$ 8,8 µM und V_{max} von 492 nmol min⁻¹ mg⁻¹ mit GCoA als Substrat und K_m 14 µM und V_{max} von 308 nmol min⁻¹ mg⁻¹ mit MCoA als Substrat. Der Vergleich der katalytischen Effizienz deutete dabei weiter eine Präferenz der GCase für GCoA an. Wurde die rekombinante MCase näher charakterisiert, so war es möglich, ähnliche kinetische Konstanten wie für das Wildtypenzym aus *P. aeruginosa* zu bestimmen (K_{0.5} 9,8 µM und V_{max} von 279 nmol min⁻¹ mg⁻¹). Weiterhin konnte eine kinetische Abhängigkeit von den Substrate ATP und NaHCO₃ gezeigt werden, wobei diese ein sigmoidales Verhalten mit Konstanten von K_{0.5} 13 µM und V_{max} von 356 nmol min⁻¹ mg⁻¹ für ATP und K_{0.5} 0,8 µM und V_{max} von 178 nmol min⁻¹ mg⁻¹ für NaHCO₃ zeigten. Durch dieses Verhalten wird von den Autoren eine allosterische Regulation der MCase durch ATP und Hydrogencarbonat vermutet (Aguilar et *al.*, 2008). Geranyl-CoA wurde wie bereits schon durch Fall (1981) beschrieben auch in diesem Falle nicht als Substrat umgesetzt.

Warum aber konnte in dieser Arbeit keine aktive Geranyl-CoA Carboxylase erhalten werden? Das Problem durch eine mögliche veränderte Anordnung der Gene (siehe pJoe4036.1::*atuCF*) konnte zwar aufgrund der nicht möglichen gemeinsamen Reinigung der Untereinheiten resultierend aus dem Konstrukt pJoe4036.1::*atuCDEF* nicht ausgeschlossen werden, jedoch ist dies aufgrund der erfolgreichen Klonierung und Expression der Gene der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase über das Konstrukt pJoe4036.1::*liuBCD* unwahrscheinlich. Dass die Produktion von rekombinantem Protein inaktives Protein liefert, kann vielerlei Gründe haben. So z.B. unphysiologisch hohe Konzentrationen des Proteins in der Wirtszelle. Da dies jedoch vor allem bei regulatorischen Proteinen, welche unter natürlichen Bedingungen nur in sehr geringen Mengen produziert werden, von Bedeutung ist, kann dies im Falle der GCase eher ausgeschlossen werden. Da die Geranyl-CoA Carboxylase ein lösliches Protein im

Cytoplasma darstellt, können Probleme der Sekretierung ebenfalls ausgeschlossen werden. Weitere mögliche Gründe sind ein anderes intrazelluläre Milieu (pH, Redoxpotential, Konzentration gebundenen Wassers) und das Vorhandensein von anderen Proteasen in der Wirtszelle bzw. die Notwendigkeit der Co-Expression von Proteinen, die z.B. bei der Faltung relevant sind (Chaperone, Rotamasen, Proteindisulfid-Isomerase, Peptidyl-prolyl-cis/trans-Isomerasen) oder von post-translationale Modifikationen, welche in der Wirtszelle nicht möglich sind (z.B. Biotinylierung, Glycosylierung im endoplasmatischen Retikulum der eukarotischen Zelle). Aufgrund der erfolgreichen Reinigung der Geranyl-CoA Carboxylase aus Pflanzenteilen (Guan et al., 1999) und P. aeruginosa PAO1 bzw. der Isolierung und Charakterisierung des rekombinanten Enzyms aus E. coli (Aguilar et al., 2008) ist es jedoch unwahrscheinlich, dass die hier angeführten Gründe lediglich in der vorliegenden Arbeit zu Problemen mit der Aktivität der GCase führen sollen. In folgenden Arbeiten sollte jedoch der Einfluss der bereits besprochenen Biotinylierung, welche möglichweise im Falle der GCase nicht ausreichend erfolgte, untersucht werden. Gegebenenfalls ist es möglich durch die Expression des Biotin Ligase Gens eine vollständige Versorgung mit Biotin zu ermöglichen und damit aktive Geranyl-CoA Carboxylase zu erhalten. Des Weiteren könnten mit den Proteinen AtuC und AtuF, welche über die Expression des Konstruktes pJoe4036.1::atuCF in E.coli und Reinigung über Ni-NTA Agarose erhalten werden konnten, Denaturierungs- und Renaturierungsversuche vergleichend zu den Arbeiten von Aguilar et al. (2008, Untereinheiten der MCase) durchgeführt werden. Gegebenenfalls kann auf diesem Wege aktives GCase Enzym bereitgestellt werden, denn erst wenn die Geranyl-CoA Carboxylase mit signifikanten Aktivitäten vergleichend zur Methylcrotonyl-CoA Carboxylase zur Verfügung steht, können auch die Untersuchungen mit den nun vorliegenden Substraten cisund trans-Geranyl-CoA sowie Methylcrotonyl-CoA erfolgen. Erst in diesem Fall wird eine Aussage zu einer möglichen Beeinflussung der GCase Reaktion durch das cis bzw. das trans Isomer des GCoAs möglich.

5.4.3. Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase - AtuE

Die Funktion der Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase wurde in früheren Arbeiten aufgrund der Ähnlichkeit zu Proteinen bekannter Funktion (Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase) dem AtuE zugewiesen (Höschle et *al.*, 2005; Förster-Fromme et *al.*, 2006; Förster-Fromme & Jendrossek, 2006). Durch 2D-Gel-Elektrophorese konnte gezeigt werden, dass das Protein AtuE spezifisch nur in Zellen gebildet wurde, welche mit Citronellol oder Citronellate als C-

und Energiequelle angezogen wurden. Dagegen konnte es nicht in Zellen identifiziert werden, welche mit Isovalerat oder Succinat kultiviert wurden. Wurde eine entsprechende Insertionsmutante untersucht, so zeigte sich in Wachstumsanalysen kein Verlust der Fähigkeit auf azyklischen Terpenoiden zu wachsen. Es wird daher angenommen, dass die Funktion von AtuE wichtig, unter diesen Bedingungen jedoch nicht essentiell für den Atu Stoffwechselweg ist, da die Funktion der Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase auch durch andere Isoenzyme ausgeführt werden kann (Förster-Fromme et *al.*, 2006).

Für weiterführende experimentelle Untersuchungen wurde das Gen *atuE* aus *P. aeruginosa* in *E. coli* exprimiert und das synthetisierte Protein folgend über Affinitätschromatographie aufgereinigt. Versuche zur Bestimmung der Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase Aktivität erfolgten erstmals bei Seubert & Fass (1964a), welche Untersuchungen mit einem angereichertem Enzymgemisch, welches die Hydratase sowie die 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase enthielt, durchführten. Eine optische Bestimmung der Aktivität des Enzyms wurde in diesen Arbeiten durch das Verschwinden der charakteristischen Absorptionsbande von α , β -ungesättigten Thioestern durch Anlagerung von Wasser an die Doppelbindung bestimmt. Die Bereitstellung des Substrates der Hydratase erfolgte bei den Autoren durch Vorinkubation von Geranyl-CoA mit einem ATP-generierenden System und gereinigter Geranyl-CoA Carboxylase (Seubert & Fass, 1964a).

Der Versuch die Aktivität über die vorgeschaltete Reaktion der Geranyl-CoA Carboxylase, in welcher das Substrat der Hydratase Isohexenyl-glutaconyl-CoA generiert wird, zu erhalten, war in dieser Arbeit jedoch aufgrund der fehlenden GCase Aktivität nicht möglich. Zwar stand im weiteren Verlauf der Arbeit die Ausgangsverbindung für die Synthese des Isohexenyl-glutaconyl-CoAs als Isomerenmischung durch Arbeiten am Institut für Organische Chemie zur Verfügung, allerdings konnte mit dem aus diesem hergestellten Substrat keine Aktivität von rekombinantem AtuE als Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase gezeigt werden. Da eine fehlende Aktivität auch durch die heterologe Synthese in *E. coli* begründet sein könnte, wurden die Versuche außerdem mit Rohextrakt von *P. aeruginosa* PAO1 (Cs Zellen) als Quelle der Wildtyp-Hydratase wiederholt. Allerdings konnten in diesen Experimenten ebenfalls keine Hydratase Aktivitäten mit dem Substrat bestimmt werden. Da, wie bereits an anderer Stelle beschrieben wurde, nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine Induktion des Atu-Weges in Zellen dieser Enzymcharge nicht erfolgreich war, sollten zur Überprüfung in folgenden Arbeiten die Assays auch mit neuem Wildtypenzym wiederholt werden.

Seubert und Mitarbeiter führten 1968 Untersuchungen zum Mechanismus der Malonyl-CoA unabhängigen Fettsäuresynthese durch (Seubert et *al.*, 1968). In dieser Arbeit wurde die Aktivität der Enoyl-CoA Hydratase über einen gekoppelten Assay mit β -Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase gemessen (Abb. 5.9). Die Aktivität der Hydratase wurde über die Bildung von NADH bei 366 nm bestimmt. Der Ansatz enthielt in 1,75 ml: 200 µmol Tris-HCl, pH 8,9 sowie 1 mg BSA, 1 µmol NAD⁺, 0,07 µmol Decenyl-CoA und 0,9 U Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase. Gestartet wurde die Reaktion durch die Zugabe des Enoyl-CoA Hydratase Enzyms.



Abb. 5.9: Bestimmung der Enoyl-CoA Hydratase Aktivität in einem gekoppelten Assay nach Seubert et. *al.*, 1968 (R=H, aliphatischer oder aromatischer Rest)

Ein solch gekoppelter Assay scheint jedoch für die vorliegende Arbeit nicht geeignet. Im Falle der β -Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase sind lediglich Untersuchungen zur Spezifität hinsichtlich der Kettenlänge (Osumi & Hashimoto, 1980; He et *al.*, 1989; Uchida et *al.* 1992; Arent et *al.*, 2010), nicht aber zu Substraten mit verzweigter Kohlenstoffkette bekannt. Aufgrund der verzweigten Kohlenstoffkette des Isohexenyl-glutaconyl-CoAs **20**, als Substrat der in dieser Arbeit untersuchten Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase, resultiert die ebenfalls verzweigte Struktur des 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoAs (**21**, Abb. 5.10). Diese Verbindung stellt sehr wahrscheinlich kein Substrat der Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase dar.



Abb. 5.10: Struktur des Hydratase-Substrates Isohexenyl-glutaconyl-CoA 20 und des Hydratase-Produktes 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA 21 des Atu-Weges

Bei Holland et al. (1973) erfolgte die Messung der Hydratase Aktivität auf zwei Wegen. Zum einen wurde die Hydratisierung von 2,3-ungesättigten Acyl-CoA Estern über die Abnahme der Absorption bei 263 nm (Lynen & Ochoa, 1953; Seubert & Lynen, 1953) bei 30 °C und pH 7,5 verfolgt. Der Testansatz der Autoren enthielt neben 28 mM Tris-HCl und 2,5 mM EDTA 6-100 mmol an Substrat. Die Reaktion wurde durch die Zugabe der Enoyl-CoA Hydratase gestartet. Zum anderen erfolgte auch in dieser Arbeit eine Kopplung der Enoyl-CoA Hydratase mit der *L*-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase und NAD⁺. Bei Schultz (1974) und Fong & Schultz (1977) wurde auch der direkte Assay zur Bestimmung der Aktivität der Hydratase herangezogen, wobei der Testansatz (0,6 ml) in diesem Falle 50 bzw. 100 µmol Kalium-Phosphatpuffer (pH 8) und 50 µg BSA neben dem $\Delta^{2,3}$ -enoyl-CoA Substrat und der gereinigte long chain Enoyl-CoA Hydratase enthielt. Ähnlich wurde auch bei O'Brien & Frerman (1977) verfahren. Auch in neueren Arbeiten erfolgte die Messung der Enoyl-CoA Hydratase Aktivität über die Abnahme der Absorption bei 263 nm und 30 °C (Fukui et al., 1998; Tsuge et al., 2003; Sato et al. 2011). Dabei setzte sich der Testansatz aus 50 mM Tris-HCl pH 8 und 25 µM trans-enoyl-CoA zusammen. Weiterhin konnte in den Arbeiten von Tsuge et al. (2003) und Sato et al. (2011) die Stereoselektivität durch Kopplung der Hydratisierung von trans-2-enoyl-CoA mit der Oxidation des resultierenden 3-Hydroxyacyl-CoAs (3HA-CoA) katalysiert durch die (S)-spezifische 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase (3HA-CoA DH) aus Schweineherz untersucht werden. Durch die Verlinkung der NADH Bildung mit der Oxidation von (S)-3HA-CoA (gemessen bei 340 nm) kann in diesem Falle eine Aussage über die Stereospezifität getroffen werden, wobei bei einer zu beobachtenden Absorptionsänderung bei 340 nm eine (S)-Selektivität des Enzyms vorlag. Bei Tsuchida et al. (2011) erfolgte dagegen eine direkte Quantifizierung der Produkte 3(R)- und 3(S)-Hydroxyacyl-CoA über HPLC mittels einer chiralen Säule. Für diese neue Methode wurden die Konditionen unter Verwendung von 3(R)-, 3(S)-Hydroxyhexadecanoyl-CoA und trans-2-hexadecanoyl-CoA optimiert (mobile Phase: 35/65 (v/v) 50 mM Phosphat-Puffer pH 5,0/Methanol, Flussrate: 0,5 ml/min, Detektion: 260 nm, Säulentemperatur: 25 °C).

Auch in der Arbeit von Feil (2006), in welcher die Aktivität einer (*E*)-Phenylitaconyl-CoA Hydratase bestimmt wurde, enthielt der Testansatz neben dem Protein lediglich das Substrat in 50 mM Kalium-Phosphatpuffer pH 6,2. In der vorliegenden Arbeit wurde somit auch ein solcher Ansatz getestet, indem lediglich Puffer, Substrat und Enzym eingesetzt wurden. In den Reaktionen, welche mit 50 mM Kalium-Phosphatpuffer bzw. Tris-HCl Puffer mit unterschiedlichen pH-Werten (7; 7,5 und 8,0) durchgeführt wurden, konnten allerdings keine Absorptionsänderungen bei einer Wellenlänge von 267 nm (30 °C) verfolgt und somit keine Aktivitäten der nativen bzw. der rekombinanten Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase bestimmt werden. Letztendlich stand für das mögliche Optimieren der Reaktion (Puffer, pH, Temperatur) nicht ausreichend Zeit zur Verfügung, sodass eine Aktivität des Wildtypenzyms bzw. des rekombinanten Enzyms AtuE aus *E. coli* in dieser Arbeit jedoch nicht ausgeschlossen werden kann. Weiterführende Untersuchungen sind im Rahmen nachfolgender Arbeiten unerlässlich.

Da das Substrat in diesen Untersuchungen lediglich als Isomerenmischung zur Verfügung stand, könnte auch dies ein Grund für eine fehlende Aktivität darstellen. Eine Trennung der Isomere war auf der Stufe der Methylester-Vorstufe möglich, allerdings konnten diese nicht in die CoA-Ester Synthese eingesetzt werden. Um eine Verseifung der Ester nach Aktivierung zum CoA-Ester zu erwirken, ohne dass auch das CoenzymA wieder abgespalten wird, sind Ester als Vorstufe erforderlich, welche sich unter milden Reaktionsbedingungen wieder spalten lassen. Hierfür könnte die Geranylsäure in das entsprechende Benzyl- oder. *tert*-Butylester überführt werden, um dann über die CO₂-Reaktion nach Saito et *al.* (2000) die entsprechenden Vorstufen zu erhalten.

Wie bereits beschrieben zeigte das AtuE eine hohe Ähnlichkeit zu Proteinen mit Enoyl-CoA Hydratase/Isomerase Funktion (Höschle et *al.*, 2005; Förster-Fromme et *al.*, 2006; Förster-Fromme & Jendrossek, 2006).

Die Enoyl-CoA Hydratase spielt bei der β -Oxidation, und somit dem Fettsäureabbau eine entscheidende Rolle. Die sich wiederholende Reaktionsfolge der β -Oxidation umfasst vier Reaktionen, die Oxidation, eine Wasseranlagerung sowie eine erneute Oxidation und eine Thiolyse durch CoenzymA, wobei die Länge der Acylkette in jedem Zyklus um zwei C-Atome unter Bildung von Acetyl-CoA **24** verkürzt wird (Kunau et *al*, 1995). Liegen Fettsäuren mit einer ungeraden Anzahl an C-Atomen vor, so wird in der letzten Runde der β -Oxidation Propionyl-CoA gebildet, welches über die Reaktionen der Propionyl-CoA Carboxylase und der Methylmalonyl-CoA Mutase zu Succinyl-CoA, einem gebräuchlicheren Stoffwechsel-Intermediat weiter umgesetzt wird (Halarnka & Blomquist, 1989). Die vier Enzyme, welche diesen Reaktionszyklus (Abb. 5.11) antreiben, sind die Acyl-CoA Dehydrogenase, die Enoyl-CoA Hydratase, die (*L*)-3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase und die Thiolase. Für den Abbau in Mitochondrien konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Reaktionen durch separate Enzyme katalysiert werden, wohingegen andere Zellorganellen z.B. Peroxisomen multifunktionale Proteine enthalten, welche zwei oder aber drei Reaktionen der Reaktionsabfolge katalysieren (Carpenter et *al.*, 1992; Uchida et *al.*, 1992).



Abb. 5.11: Schematische Darstellung der β-Oxidation lang-kettiger Fettsäuren in Mitochondrien modifiziert nach Agnihotri & Liu, 2003 (R=CH₃ oder aliphatischer Rest)

Die Enoyl-CoA Hydratase katalysiert somit den zweiten Schritt in der β -Oxidation des Fettsäurestoffwechsels. Das Enzym ermöglicht die syn-Addition eines Wassermoleküls über die Doppelbindung eines trans-2-enoyl-CoA Thioesters, unter Bildung eines (S)-3-Hydroxyacyl-CoA Thioesters (Stern & Campillo, 1953; Stern, 1961; Willadsen & Eggerer, 1975; Agnihotri & Liu, 2003). Dabei variiert die Stereoselektivität der Enoyl-CoA Hydratase. Während das Enzym aus tierischen Mitochondrien (S)-3-Hydroxyacyl-CoA generiert (Willadsen & Eggerer, 1975), wird durch das Enzym aus Aeromonas caviae (R)-3-Hydroxyacyl-CoA gebildet (Fukui et al., 1998). Nichtsdestotrotz konnte auch eine Katalyse von cis-2-enoyl-CoA zum entsprechenden (R)-3-Hydroxyacyl-CoA Thioester gezeigt werden (Wu et al., 2000). Die ausführlichsten Untersuchungen wurden dabei mit Enzym aus Säugetieren durchgeführt. Anfänglich wurde die Hydratase aus Rinderleber gereinigt und charakterisiert (Steinman & Hill, 1975). Andere Quellen, um das Enzym zu erhalten, stellten Schweineherz (Fong & Schultz, 1981), Schweineniere (Büttner, 1989) und Rattenleber (Furuta et al., 1980) dar. Später wurde die Hydratase aus Rinderleber auch nach heterologer Überexpression in E. coli gereinigt, und es konnte gezeigt werden, dass die Eigenschaften des rekombinanten Enzyms gleich dem nativen Enzym waren (Dakoji et al., 2001). Durch strukturelle Arbeiten konnte die drei-dimensionale Struktur des mitochondrialen Rattenleber Enoyl-CoA Hydratase Komplexes mit Acetoacetyl-CoA und Octanoyl-CoA gelöst werden (Engel et al., 1996; Engel et al., 1998). Die quartäre Struktur (Homohexamer) wurde als Dimer eines Trimers mit 261

Aminosäureresten für jede Untereinheit beschrieben (Engel et al., 1996; Minami-Ishii et al., 1989). Das aktive Zentrum wird hauptsächlich durch das jeweilige Monomer gebildet, wobei einige Aminosäurereste, welche die Bindungstasche auskleiden (Lys²⁶⁰, Phe²⁷⁹ und Lys²⁸²) von einer benachbarten Untereinheit im Hexamer beigesteuert werden. Die Carbonylgruppe des Substrates Octanoyl-CoA liegt in der entsprechenden Struktur mit einem Abstand einer Wasserstoffbrückenbindung innerhalb des strukturell konservierten Rückgrates der Amidgruppen von Ala⁹⁸ und Gly¹⁴¹ vor (Holden et al., 2001). Aufgrund der dreidimensionalen Struktur wurde ein katalytischer Mechanismus mit einer Schlüsselrolle von Glu¹⁴⁴ und Glu¹⁶⁴ vorgeschlagen (Abb. 5.12). Dabei aktiviert Glu¹⁴⁴ ein Wassermolekül für einen nukleophilen Angriff an das C(3) und Glu¹⁶⁴ protoniert das C(2) der ungesättigten Fettsäure 149. In dieser Reaktion liegt die negative Ladung beim Sauerstoff der Carbonylgruppe des Thioesters. Sie wird stabilisiert durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit den zwei Amidgruppen von Ala⁹⁸ und Gly¹⁴¹, welche in einer konservierten Oxyanion-Nische liegen (Holden et al., 2001). Die Hydratisierung von α,β-ungesättigten Enoyl-CoA Thioestern 149 zu den entsprechenden β-Hydroxyacyl-CoA Thioestern 150 erfolgt dabei ohne die Beteiligung von Cofaktoren oder Metallionen (Agnihotri & Liu, 2003).



Abb. 5.12: Möglicher Reaktionsmechanismus der Hydratisierung eines Enoyl-CoA Thioesters 149 durch die Enoyl-CoA Hydratase basierend auf der 3D-Röntgenstruktur (Holden et *al.*, 2001) (R=CH₃ oder aliphatischer Rest) Nähere Erläuterungen siehe Text.

Im photosynthetisch aktiven Bakterium *Rhodobacter capsulatus* konnte durch Beckman und Kranz (1991) ein *open reading frame* identifiziert werden, wobei die resultierenden 257 Aminosäuren homolog zur mitochondrialen und peroxisomalen Enoyl-CoA Hydratase der Ratte und zum *fadB* Genprodukt, der α -Untereinheit des Fettsäure-oxidierenden Komplexes aus *E. coli* waren. Während die β -Oxidation in den Mitochondrien durch vier einzelne Enzyme katalysiert wird, erfolgt dies in Peroxisomen und *E. coli* unter Verwendung von multifunktionalen Enzymen. Es konnte gezeigt werden, dass das peroxisomale Multifunktionsprotein drei Aktivitäten besitzt. Dabei handelt es sich um die Aktivität als 2-Enoyl-CoA Hydratase, 3-Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase und Δ^3 , Δ^2 -Enoyl-CoA Isomerase (Palosaari & Hiltunen 1990). Zusätzlich zu diesen drei Aktivität auf (DiRusso, 1990). Die Ähnlichkeit in Größe und Sequenz ließ die Autoren vermuten, dass *Rhodobacter capsulatus* Fettsäuren unter Verwendung von speziellen Komponenten, ähnlicher dem mitochondrialen System als dem multifunktionales Enzymsystem vergleichend zu *E. coli* oxidiert (Beckman & Kranz, 1991).

Der aus einer Bodenprobe isolierte Organismus Aeromonas caviae akkumuliert Polyhydroxyalkanoate (PHA) bei Wachstum mit Alkansäuren und pflanzlichen Ölen als alleinige C-Quelle über short und medium chain-length (C4 bis C7) 3-Hydroxy-alkanoat (3HA) Einheiten (Doi et al., 1995). Das Zwischenprodukt der β-Oxidation trans-2-enoyl-CoA wird über eine (R)-spezifische Hydratisierung katalysiert durch die (R)-spezifische Enoyl-CoA Hydratase (PhaJ_{Ac}) zu (R)-3-Hydroxyacyl-CoA umgesetzt, wobei diese CoA-Ester anschließend mit Hilfe der PHA Synthase (PhaCAc) zu PHA polymerisieren (Fukui & Doi, 1997; Fukui et al., 1998). Das Gen der PHA Synthase (PhaCAc) ist im pha Operon mit den Genen für die (R)-spezifische Enoyl-CoA Hydratase (PhaJAc) organisiert (Fukui & Doi, 1997). Auch für die Organismen Pseudomonas oleovorans, Pseudomonas putida und Pseudomonas aeruginosa ist bekannt, dass sie in der Lage sind, PHA aus medium chainlength (C6 bis C14) 3-Hydroxy-alkanoat (3HA) Einheiten zu akkumulieren, wenn eine Anzucht mit Alkansäuren oder pflanzlichen Ölen als alleinige C-Quelle erfolgt (Huisman et al., 1989). Auch in diesen Organismen erfolgt die Bereitstellung der PHA Vorstufe über die β-Oxidation (Huijberts et *al.*, 1994). Im Gegensatz zum *phaJ*_{Ac} war das Gen für das Monomer liefernde Genprodukt in diesen Organismen jedoch nicht mit den PHA Biosynthesegenen lokalisiert (Tsuge et al., 2000). Erst nach der vollständigen Sequenzierung des Genoms von P. aeruginosa PAO1 konnten verschiedene Gene homolog zum phaJAc identifiziert werden. Zunächst handelte es sich dabei um die Gene phaJ1_{Pa} und phaJ2_{Pa}. Diese wurden aus

P. aeruginosa kloniert und die Fähigkeit der entsprechenden Genprodukte Monomere für die PHA-Synthese bereitzustellen in E. coli DH5a getestet. Die rekombinanten Stämme zeigten folgend eine hohe (R)-spezifische Enoyl-CoA Hydratase Aktivität mit verschiedenen Substraten, wobei PhaJ1_{Pa} eine Spezifität für short chain-length Enoyl-CoA (C4-C6) und PhaJ2_{Pa} eine Spezifität für medium chain-length Enoyl-CoA Substrate (C6-C12) zeigte. Weiterhin konnte von den Autoren bei Coexpression der Hydratasegene mit dem PHA Synthasegen in E. coli LS5218 die Akkumulierung von PHA bei Wachstum auf Dodekanoate als alleinige C-Quelle beobachtet werden (Tsuge et al., 2000). Später konnten auch die Gene phaJ3_{Pa} und phaJ4_{Pa} identifiziert und untersucht werden. Das rekombinante Protein PhaJ3_{Pa} war in den Untersuchungen spezifisch für medium chain-length Enoyl-CoA Substrate mit einer Kettenlänge von C8-C12 und PhaJ4_{Pa} für medium chain-length Enoyl-CoA mit einer Kettenlänge von C6-C10, wobei das letztere PhAJ Protein im Gegensatz zu den drei anderen eine relativ geringe (R)-Spezifität aufwies (Tsuge et al., 2003). In der untersuchten PHA Akkumulation in E. coli stellten sich die Enzyme PhaJ1_{Pa} und PhaJ4_{Pa} als sehr nützliche metabolic tools für die Synthese von PHA heraus. Sie wurden daher von den Autoren ausgewählt, aus den rekombinanten E. coli Stämmen gereinigt und weiter untersucht. Durch MALDI-TOF MS wurde das jeweilige Molekulargewicht mit 16,75 und 16,57 kDa bestimmt. Über Gelfiltrations-Chromatographie erhielten die Autoren ein Molekulargewicht mit 38 und 39 kDa, wodurch eine Struktur als Homodimer im nativen Zustand für beide Enzyme vergleichend zum PhaJ4_{Ac} (Fukui et *al.*, 1998) postuliert werden konnte (Tsuge et *al.*, 2003).

Enoyl-CoA Hydratasen können demnach je nach Organismus eine unterschiedliche Struktur aufweisen. Eine Untersuchung der Struktur der Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase (AtuE) stellt somit einen interessanten Aspekt nicht nur im Vergleich zu den ähnlichen Enoyl-CoA Hydratsen dar, sondern auch in Hinblick auf die nähere Untersuchung eines Reaktionsmechanismus. In der vorliegenden Arbeit erfolgten die Vorarbeiten für diese Untersuchungen, indem das Gen *atuE* aus *P. aeruginosa* PAO1 kloniert und die vermutete Hydratase rekombinant in *E. coli* synthetisiert wurde. Das schließlich gereinigte Protein wurde in Kristallisationsstudien eingesetzt, wobei allerdings erst kürzlich die Struktur mit einer Auflösung von 2,3 Å gelöst werden konnte. Dabei zeigte sich, dass die Struktur von AtuE der Struktur der Enoyl-CoA Hydratasen entspricht (Abb. 5.13). Für genauere Aussagen sind jedoch weitere Arbeiten mit den erhaltenen Daten erforderlich (persönliche Mitteilung Dr. Papageorgiou, Universität von Turku, Finnland), sodass dies noch Zeit in Anspruch nehmen wird und somit in sich anschließenden Arbeiten weiter verfolgt werden muss.



Abb. 5.13: Vorläufige Struktur des AtuE-Trimers (zur Verfügung gestellt von Dr. Papageorgiou)

Nichtsdestotrotz könnten schon jetzt Versuche unternommen werden, das Protein AtuE mit dem in dieser Arbeit hergestellten Substrat Isohexenyl-glutaconyl-CoA zu kristallisieren, um Stukturvergleiche mit und ohne Substrat zu ermöglichen. Durch Vergleich mit ähnlichen Proteinen könnten wichtige Bereiche und durch gezielte Mutagenese damit auch essentielle Aminosäuren in der Struktur ausfindig gemacht werden.

Erste Vermutungen konnten durch die Arbeiten in der Organischen Chemie angestellt werden. Hier wurden Indizien gefunden, dass Zink bei der Hydratase Reaktion eine Rolle spielen könnte. Im Abschnitt 4.8.2. erfolgte der Versuch das Produkt der Reaktion als Vorstufe über eine Reformatsky-Reaktion darzustellen. In einem ersten Syntheseversuch konnte das Produkt aufgrund der unvollständigen Analytik jedoch nur vermutet werden, wohingegen in einer Variation der Reaktion eine Retro-Reformatsky-Reaktion festgestellt werden konnte, welche vermuten lies, dass das Intermediat, in diesem Fall die gewünschte Vorstufe des Hydrataseproduktes, lediglich als instabile Zwischenverbindung vorliegt. Die Beteiligung von Zink als möglicher Cofaktor würde einen Unterschied zu den Enoyl-CoA Hydratasen darstellen, welche die Hydratisierung von α,β -ungesättigten Enoyl-CoA Thioestern ohne die Beteiligung von Cofaktoren oder Metallionen katalysieren (Agnihotri & Liu, 2003). Eine Beteiligung von Zink an der eigentlichen Enzymreaktion konnte in dieser Arbeit jedoch nicht mehr gezeigt werden. Eine Möglichkeit, um eine Aussage über den Zinkgehalt im Protein treffen zu können, wäre die Durchführung einer Atom-Absorptions-Spektrometrie (AAS). Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass Licht verschiedener Wellenlängen mit einer bestimmten Intensität durch eine atomisierte Probe absorbiert und dadurch geschwächt wird. Der Metallgehalt in einer Probe kann dabei durch das Verhältnis von Intensität des ungeschwächten Lichtes und der Intensität des absorbierten Lichtstrahles durch das zu messende Element bestimmt werden, wobei eine Atomisierung der Probe durch starkes Erhitzen im Graphitrohr erfolgt.

5.4.4. 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase - AtuA?

Durch Datenbankvergleiche und erste experimentelle Untersuchungen konnte den Genen des Atu-Weges mit Ausnahme vom AtuA zumindest eine hypothetische Funktion zugeordnet werden (Kap.5.1, Tab. 5.1). Das Protein AtuA allerdings zeigte keine Ähnlichkeiten zu Proteinen bekannter Funktion. Die Funktion des *atuA*'s ist somit noch unbekannt. Durch die Arbeiten von Förster-Fromme et *al.* (2006) und Förster-Fromme & Jendrossek (2006) konnte allerdings gezeigt werden, dass das Gen, welches das Protein AtuA (unbekanntes hypothetisches Protein) codiert, spezifisch in Citronellol- und Citronellat-Kulturen exprimiert wurde. Und auch eine entsprechende Insertionsmutante (ins:*atuA*) wies auf eine essentielle Funktion des Proteins im Atu-Stoffwechsel hin, da die Mutante die Fähigkeit verlor, azyklische Terpenoide zu verwerten (Förster-Fromme et *al.*, 2000). Durch Verwendung des pKnockout-G Plasmids (Windgassen et *al.*, 2000) konnten polare Effekte ausgeschlossen werden, und die Unfähigkeit auf Terpenoiden zu wachsen, der Mutation im *atuA* zugewiesen werden. Mittels folgender Rekonstitutionsanalysen mit *atuA* in *trans* konnte der Wildtyp-phänotyp wieder hergestellt werden (Förster-Fromme & Jendrossek, 2006).

Der Abbau von azyklischen Terpenoiden umfasst im *acyclic terpene utilisation pathway* sieben enzymatische Reaktionen, wobei das *atu*-Gencluster acht Strukturgene beinhaltet, welche für die entsprechenden Proteine codieren. Da die Geranyl-CoA Carboxylase Untereinheiten durch zwei Gene codiert werden (*atuC* und *atuF*) stehen für die Besetzung der noch verbleibenden sechs Enzymreaktionen sechs Proteine zur Verfügung. Durch die Sequenzähnlichkeiten der Proteine konnten die entsprechenden Reaktionen mit Ausnahme der 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase (HHG-CoA Lyase) Funktion theoretisch besetzt werden. Aufgrund der essentiellen Rolle des AtuA Proteins in diesem Stoffwechsel, wird vermutet, dass das AtuA somit die Funktion der 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase (Förster-Fromme et *al.*, 2006).

Bei der Verstoffwechselung von azyklischen Terpenoiden über den Atu- und den Liu-Weg sind zwei Lyasen mit einer ähnlichen Funktion an der Eliminierung der Seitenkette beteiligt. Dabei handelt es sich um die HHG-CoA Lyase (Atu-Weg) und die 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Lyase (HMG-CoA Lyase, Liu-Weg, LiuE, Förster-Fromme et *al.*, 2006). Gegenwärtig ist allerdings experimentell noch nicht geklärt, ob diese beiden Reaktionen durch ein unspezifisches Enzym oder durch zwei verschiedene Lyasen mit unterschiedlicher Substratspezifität katalysiert werden. Beide Proteine AtuA und LiuE als putative Lyasen sind verschieden, weisen keine Sequenzähnlichkeiten auf und durch die Unterschiede in den Reaktionsprodukten (Abspaltung von Acetat **22** (HHG-CoA Lyase) bzw. Acetyl-CoA **24** (HMG-CoA Lyase), Abb. 5.14) sind auch strukturelle Unterschiede sehr wahrscheinlich. Weiterhin ist bekannt, dass die HHG-CoA Lyase nicht die Funktion der HMG-CoA Lyase *in vitro* übernehmen kann (Seubert & Fass 1964a). Da die Sequenz einer HHG-CoA Lyase noch nicht beschrieben wurde und auch die Reaktionsprodukte (Seubert & Fass, 1964b) sich vergleichend zur HMG-CoA Lyase unterscheiden, ist es nicht verwunderlich, dass Ähnlichkeiten zu Proteinen bekannter Funktion von AtuA in den Datenbanken fehlen.

Da das Substrat der 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase kommerziell nicht erhältlich ist, sollte dieses in der vorliegenden Arbeit über die Reaktionsfolge Geranyl-CoA Carboxylase und Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase bereitgestellt werden. Da eine Aktivität der GCase jedoch auch über die verschiedensten Bemühungen nicht erhalten werden konnte, war eine Generierung des Substrates auf diesem Wege nicht möglich. Auch die Versuche die Verbindung über chemische Synthese unter besonderer Berücksichtigung des Aufbaus des Chiralitätszentrums darzustellen, waren im Rahmen dieser Arbeit nicht erfolgreich.



Abb. 5.14: Darstellung der unterschiedlichen Reaktionsprodukte der 3-Hydroxy-3-isohexenylglutaryl-CoA:Acetat Lyase (HHG-CoA Lyase) und der 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA Lyase (HMG-CoA Lyase, LiuE) nach Seubert & Fass (1964b)

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit beschriebenen Arbeiten war es durch Seubert und Fass (1964a) möglich mit einem angereicherten Enzymgemisch, welches sowohl die Hydratase als auch die 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA:Acetat Lyase enthielt, eine Lyase Aktivität über den Einbau von radioaktivem ¹⁴CO₂ in die Essigsäure zu bestimmen. Der Einbau erfolgte dabei in Gegenwart von Geranyl-CoA, ATP, Mg²⁺, sowie den Hilfsenzymen Geranyl-CoA Carboxylase (Seubert et *al.*, 1963) und Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase.

Aufgrund der hohen Ähnlichkeiten in der Aminosäuresequenz von LiuE zu HMG-CoA Lyasen, wurde für dieses Protein eine Funktion als HMG-CoA Lyase im Liu-Weg vorgeschlagen (Höschle et *al.*, 2005; Aguilar et *al.*, 2006; Förster-Fromme et *al.*, 2006).

Eine entsprechende Mutante im *liuE* Gen von *P. aeruginosa* war nicht mehr in der Lage sowohl Leucin/Isovalerat als auch azyklische Terpenoide zu verwerten. Wuchs die Mutante mit Citronellol im Medium, so wurden Metabolite des *acyclic terpene pathway* akkumuliert, wodurch von den Autoren eine Funktion im Leucin/Isovalerat und auch die Beteiligung beim Abbau von azyklische Terpenoiden angenommen wurde (Chávez-Avilés et *al.*, 2009). Zur näheren Untersuchung wurde das LiuE als rekombinantes His-*Tag* Fusionsprotein in *E. coli*

synthetisiert und gereinigt. Es zeigte ein Molekulargewicht von 33 kDa unter denaturierenden und 79 kDa unter nicht-denaturierenden Bedingungen, was eine homodimere Konformation des Proteins vermuten lies. Die Ergebnisse aus Proteinsequenzalignments und Protein-Fingerprint Sequenzierung wiesen auf eine Funktion als 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA Lyase (HMG-CoA Lyase) hin, welche die Spaltung von 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA) zu Acetyl-CoA und Acetoacetat katalysiert. Durch Chávez-Avilés et al. (2009) konnten folgend auch die kinetischen Parameter bestimmt werden. Die HMG-CoA Lyase Aktivität wurde modifiziert nach einer Methode nach Wanders et al. (1990) bestimmt, wobei der Reaktionsmix 50 mM K₂HPO₄-Puffer pH 6,7, 10 mM MgCl₂ und gereinigtes Protein enthielt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von HMG-CoA in einer Konzentration von 10-600 µM gestartet, der Ansatz für 5 min bei 37 °C inkubiert und durch Erhitzen abgestoppt. Die Quantifizierung des Acetoacetats in der Probe erfolgte unter den von Casals et al., (2003) bzw. Wanders et al., (1988) beschriebenen Bedingungen. LiuE zeigte eine optimale HMG-CoA Lyase Aktivität bei einem pH von 7,0 und einer Temperatur von 37 °C. Der erhaltende K_m von 100 µM für HMG-CoA und ein V_{max} von 21 µmol min⁻¹ mg⁻¹ an Protein bestätigten, dass das liuE aus P. aeruginosa die HMG-CoA Lyase codiert und somit eine wichtige Rolle beim Wachstum sowohl auf Leucin als auch auf azyklischen Terpenoiden einnimmt. Des Weiteren zeigte sich eine Abhängigkeit des Enzyms von Mg²⁺ und Mn²⁺ Ionen, wie schon für die HMG-CoA Lyase von Bakterien, Vögel und Menschen gezeigt wurde (Narasimhan & Miziorko, 1992; Roberts et al., 1996; Forouhar et al., 2006; Fu et al., 2006).

Die letzten Reaktionen im *leucine catabolic pathway* (Isovaleryl-CoA Dehydrogenase, MCase, 3-Methyl-glutaconyl-CoA Hydratase, HMG-CoA Lyase) entsprechen den letzten Reaktionen im *acyclic terpenes catabolism* (Dehydrierung, Carboxylierung, Hydratisierung und Spaltung durch eine Lyase Reaktion). Nichtsdestotrotz konnte ein *atu*-Gen homolog zum *liuE* weder im *atu*-Cluster noch im Genom von *P. aeruginosa* PAO1 identifiziert werden, sodass durch die Arbeitsgruppe um Campos-García eine Beteiligung der HMG-CoA Lyase in beiden Stoffwechselwegen vermutet wird (Aguilar et *al.*, 2006; Aguilar et *al.*, 2008, Chávez-Avilés et *al.*, 2009).

Die erste Charakterisierung einer bifunktionalen Rolle des LiuE Proteins von *P. aeruginosa*, eine Funktion als HMG-CoA Lyase im Abbauweg von Leucin/Isovalert und eine Funktion als HHG-CoA Lyase im Abbauweg von azyklischen Terpenoiden übernehmend, erfolgte durch Chávez-Avilés et *al.* (2010). Die Bestimmung der HMG-CoA Lyase Funktion des Proteins konnte bereits in einer früheren Arbeit gezeigt werden (Chávez-Avilés et *al.*, 2009). Ein

Nachweis der HHG-CoA Lyase Aktivität erfolgte nun unter Bestimmung der Konzentrationsabnahme von Geranyl-CoA in einer mit rekombinanten Enzymen gekoppelten Reaktion. Die rekombinanten His-Tag Fusionsproteine Geranyl-CoA Carboxylase (AtuC/AtuF) und Isohexenyl-glutaconyl-CoA Hydratase (IHG-CoA Hydratase, AtuE) sowie LiuE aus P. aeruginosa wurden aus E. coli erhalten und gereinigt (Aguilar et al., 2008; Chávez-Avilés et al., 2009; Chávez-Avilés et al., 2010). Der Reaktionsmix (100 µl) für die Messung einer HHG-CoA Lyase Aktivität enthielt somit neben 50 mM K₂HPO₄-Puffer pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM ATP und 10 mM NaHCO₃ jeweils 30 µg GCase und IHG-CoA Hydratase, wobei die Ansätze mit und ohne LiuE (1 µg) versetzt wurden. Nach Start der Reaktion durch Zugabe von 1 mM cis-GCoA erfolgte die Inkubation des Ansatzes bei 37 °C für 10 min, bevor die Reaktion durch Zusetzten von 3 µl 25 % (v/v) HCl gestoppt wurde. Der Überstand wurde nach Entfernen der präzipitierten Proteine mit 10 µl K₂HPO₄ (2 M, pH 8,8) neutralisiert und filtriert (0,22 µm Membran). Die Quantifizierung des GCoA Thioesters erfolgte durch die Wissenschaftler im Anschluss über HPLC in Anlehnung an Hosokawa et al. (1986). Der so ermittelte Verbrauch an GCoA in den Reaktionsansätzen stellte für die Autoren ein Maß für die HHG-CoA Lyase Aktivität dar (Chávez-Avilés et al., 2010). So konnte in einem Reaktionsansatz mit allen notwendigen Enzymen (GCase, IHG-CoA Hydratase und LiuE) eine Konzentrationsabnahme von GCoA mit 1200 nmoles min⁻¹ mg⁻¹ an LiuE Protein bestimmt werden. Ein Ansatz mit lediglich GCase und IHG-CoA Hydratase zeigte eine Aktivität von 66 nmoles min⁻¹ mg⁻¹ Protein. Demgegenüber war eine Aktivität in den Kontrollen, welche nur das LiuE bzw. kein Enzym enthielten, den Autoren nach nicht zu bestimmen (Chávez-Avilés et al., 2010).

Nichtsdestotrotz, auch wenn durch die Autoren für rekombinantes, gereinigtes LiuE eine HHG-CoA Lyase Aktivität berichtet werden konnte, so kann dennoch das Vorhandensein eines spezielles HHG-CoA Lyase Enzym nicht ausgeschlossen werden. Indizien, welche für ein separates HHG-CoA Lyase Enzym sprechen, sind Daten, welche von Seubert und Mitarbeitern mit HHG-CoA Lyase enthaltenen Fraktionen erhalten wurden. Bei Seubert & Fass (1964a) ermöglichte die gemeinsame Anwesenheit von partiell gereinigter GCase, IHG-CoA Hydratase und HHG-CoA Lyase die Freisetztung von C¹⁴-markierter Essigsäure aus den eingesetzten Substraten Farnesyl-CoA und Geranyl-CoA, wobei den Ansätzen zuvor KH¹⁴CO₃ zugesetzt wurde. Vergleichend dazu konnte jedoch lediglich eine sehr geringe Aktivität mit Methylcrotonyl-CoA beobachtet werden (4 % der Aktivität mit GCoA), was ein Vorhandensein einer seperaten HHG-CoA Lyase vermuten läßt. Des Weiteren zeigte partiell gereinigte HHG-CoA Lyase im optischen Assay keine signifikante Aktivität mit dem Substrat

HMG-CoA (Seubert & Fass, 1964b). Diese Daten widersprechen der These, dass die Funktionen der beiden Lyasen durch ein und dasselbe Enzyme dargestellt werden. Ein weiterer Punkt, welcher gegen den postulierten bifunktionalen Charkter der HMG-CoA Lyase LiuE spricht, ist die Tatsache, dass beide Enzyme unterschiedliche Spaltungen (Abb. 5.14) katalysieren. Während durch die HMG-CoA Lyase Acetyl-CoA 24 freigesetzt wird, handelt es sich bei der HHG-CoA Lyase um Essigsäure 22 als Produkt der Spaltreaktion. Wie bereits zu Beginn des Abschnittes beschrieben wurde, konnte den Genprodukten des Clusters atuABCDEFGH mit Ausnahme des Proteins AtuA aufgrund der Ähnlichkeiten der Aminosäure-sequenzen zu bekannten Proteinen eine Funktion zugeordnet werden. Aufgrund dieser Zuordnung blieb allerdings die Funktion der HHG-CoA Lyase unbesetzt (Tab. 5.1). Die wichtige Rolle des Proteins AtuA während des Abbaus von azyklischen Terpenoiden wurde bereits zuvor besprochen und auch die Hinweise auf ein zur HMG-CoA Lyase verschiedenen Enzym wurden aufgezeigt. Auch durch die Tatsache, dass durch das Gen atuA ein Protein mit unbekannter Funktion codiert wird, schließt nicht die Vermutug aus, dass das AtuA die physiologische HHG-CoA Lyase in Pseudomonas darstellt, zumal homologe Gene ausschließlich in allen Citronellol-verwertenden Bakterien, deren Genom sequenziert wurde, identifiziert werden konnten (Förster-Fromme & Jendrossek, 2010).

Nichtsdestotrotz war die direkte Untersuchung von AtuA als HHG-CoA Lyase in dieser Arbeit nicht möglich, da weder eine aktive Geranyl-CoA Carboxylase, zum Verfolgen der Reaktion über die gesamte Enzymabfolge, noch die entsprechende Substrat-Vorstufe über chemische Synthese bereitgestellt werden konnte.

Die menschliche HMG-CoA Lyase steht aufgrund ihrer essentiellen Rolle im Stoffwechsel im Focus der Untersuchungen. Die katalysierte Spaltung von 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-CoA zu Acetoacetat und Acetyl-CoA (Stegink & Coon, 1968) repräsentiert den letzten Schritt des Abbaus der Aminosäure Leucin (Coon et *al.*, 1955) bzw. die Schlüsselreaktion bei der Bildung von Ketonkörpern, welche eine essentielle Energiequelle im Hungerzustand oder bei Diabetes also Zustände mit geringer Glukose-Konzentrationen im Blut darstellen (Robinson & Williamson, 1980). Das Fehlen der HMG-CoA Lyase Aktivität ist in 20 % der Fälle lethal und kann zu Schwachsinn, Schlaganfällen und Koma führen (Gibson et *al.*, 1988). Verschiedene Mutationen im HMG-CoA Lyase Gen, welche mit einer Mangelfunktion korrelierten, konnten identifiziert werden (Gibson et *al.*, 1988; Roberts et *al.*, 1996; Mitchell et *al.*, 1998; Muroi et *al.*, 2000). Die Spaltung von HMG-CoA erfordert die Anwesenheit von zweiwertigen Kationen wie Mg²⁺ und Mn²⁺ und eine Säure/Base Katalyse wurde postuliert (Fu et *al.*, 2006). Einige Reste der *active site*, mitsamt Liganden des Kations, wurden aufgrund von zielgerichteter Mutagenese und der Charakterisierung von Mutanten über kinetische und electron spin resonance Experimenten vorgeschlagen. Für His²³⁵(Roberts & Miziorko, 1997), Asp⁴² und Glu⁷² (Tuinstra & Miziorko, 2003) wurde eine Beteiligung an der Kationbindung vorgeschlagen. Asp⁴² (Tuinstra & Miziorko, 2003), His²³³ (Roberts et al., 1996) und Cys²⁶⁶ (Roberts et al., 1995) sind wichtig für die katalytische Effizienz. Ebenfalls eine wichtige katalytische Rolle spielt das Arg⁴¹, wobei diese in der Stabilisierung oder Protonierung der Enolat-Form des Acetyl-CoAs vermutet wird (Tuinstra et al., 2004). Weiterhin wurde berichtet, dass diese Reste in allen beschriebenen HMG-CoA Lyasesequenzen konserviert sind (Fu et al., 2006), das native Enzym in Lösung als ein Homodimer vorliegt (Tuinstra et al., 2002) und ein reaktives Cys³²³ mit der Regulation der Aktivität, welche die Bildung einer Disulfid-Vernetzung von zwei Untereinheiten bedeutet, in Verbindung gebracht wird (Hruz & Miziorko, 1992). Die Kristallstruktur des Enzyms konnte schließlich 2006 durch Fu et al. gelöst werden. Das Monomer der rekombinanten mitochondriale HMG-CoA Lyase (Abb. 5.15) besteht aus neun β-Faltblättern und 12 α-Helices, wobei ein $(\beta \alpha)_8$ TIM (Triose-Phosphat Isomerase) barrel Motif und eine zusätzliche Polypeptidregion bestehend aus β 9, α 11 und α 12 ausgebildet wird.



Abb. 5.15: Band-Diagramm der Monomer-Struktur der menschlichen HMG-CoA Lyase Die Struktur ist gezeigt mit β -Faltblättern in lila (beziffert vom N- zum C-Terminuns) und α -Helices in türkis. Das zusätzliche Polypeptid bestehend aus β 9, α 11 und α 12 ist in gelb dargestellt. Zu sehen ist die Sicht vom C-Terminus des ($\beta \alpha$)₈ barrel's aus und die wichtigen Aminosäurereste (Arg⁴¹, Asp⁴², Glu⁷², His²³³, His²³⁵, and Asn²⁷⁵) sind im aktiven Zentrum zu finden. Die Abbildung wurde entnommen aus Fu et *al.*, 2006.

Der N-terminale Teil des $(\beta\alpha)_8$ Motivs ist im Falle des mitochondrialen Enzyms verdeckt und das aktive Zentrum damit lediglich von der C-terminalen Seite her zugänglich. Zwei Momomere bilden das Dimer, wobei der Kontakt durch die Reste in den Strukturen β 9, α 11 und α 12, welche nicht an der Ausbildung des *barrel* Motivs beteiligt sind, ausgebildet wird (Abb. 5.16). Die Struktur eines physiologisch relevanten Dimers lies dabei vermuten, dass das Substrat die *active site* durch die Bindung einer Aushöhlung, welche am C-terminalen Ende des *barrels* lokalisiert ist, ansteuert. In der Arbeit von Fu et *al.* (2006) konnte weiterhin gezeigt werden dass die Bindung des Aktivator-Kations die Aminosäuren Asn²⁷⁵, Asp⁴², His²³³ und His²³⁵ erfordert. Arg⁴¹ ist dagegen vermutlich an der Bindung des Substrates, der Stabilisierung des anionischen Intermediates oder direkt an der chemischen Reaktion als Säure, wobei die Protonierung des C2 Enolats von Acetyl-CoA nach Spaltung der C2-C3 Bindung erfolgt, beteiligt. Letztendlich sind weiterführende Untersuchungen erforderlich, um die Base, welche das Proton von der 3-Hydroxyl-Gruppe vom HMG-CoA entzieht und die Säure, welche das C2-Atom folgend protoniert zu identifizieren (Fu et *al.*, 2006).



Abb. 5.16:Band-Diagramm der Dimer-Struktur der menschlichen HMG-CoA Lyase
Helices im Bereich der Kontaktfläche des Dimers sind in blau für das grüne Monomer bzw. in
lila für das gelbe Monomer dargestellt. Die Abbildung wurde entnommen aus Fu et *al.*, 2006.

Durch Forouhar et *al.* (2006) konnten schließlich auch die Kristallstrukturen zweier bakterieller HMG-CoA Lyasen erhalten werden. Dabei handelte es sich um Enzym zum einen aus dem Gram-positiven Eubakterium *Bacillus subtilis* und zum anderen um Enzym aus dem Gram-negativen Organismus *Brucella melitensis*. Diese beiden Enzyme zeigten eine *sequence identity* mit dem menschlichen orthologen Enzym größer als 45 %. Untersuchungen mittels Gelfiltration und *static light-scattering* (statische Lichtstreuung) deuteten darauf hin, dass das Protein aus *B. subtilis* im Kristallisationsansatz vorwiegend als Dimer, allerding mit ~10 % auch als Tetramer und in sehr geringen Mengen auch in Form große Aggragate vorliegt. Eine

vergleichbare Untersuchung der HMG-CoA Lyase aus *B. melitensis* zeigte eine Mischung aus Monomeren und Protein mit Aggregation höherer Ordnung an. Allerdings war bereits bekannt, dass beide Proteine die Tendenz haben, spontan amorphe Präzipitate in ihren Kristallisationsansätzen zu bilden, was durch Einfrieren/Auftauen oder durch Zugabe von Mg²⁺ in millimolaren Konzentrationen noch verschärft wurde (Hruz et al., 1993). Nichtsdestotrotz konnte die Kristallstruktur gelöst werden (Abb. 5.17A) und es zeigte sich, dass die Struktur der menschlichen HMG-CoA Lyase mit denen der homologen bakteriellen Proteine in nahezu allen stereochemischen Details übereinstimmte mit Ausnahme eines kleinen Unterschiedes in der Konformation des G-loops und einer Änderung des Raumwinkels des Rückgrates an nur einer Position im Protein (Forouhar et al., 2006). Die Wissenschaftler konnten das TIM barrel Motif und das katalytische Zentrum, welches eine Bindestelle für zweiwertige Kationen enthält, identifizieren (Abb. 5.17B). Das Metallbindezentrum im aktiven Zentrum ist an einem komplexen Geflecht an Interaktionen über Wasserstoffbrückenbindungen involviert. Die beteiligten Reste Gln¹⁷, Arg¹³, Glu⁴⁴, Arg¹³⁷, Tyr¹³⁹, Asp²²⁹ und Ser¹⁷³ sind dabei in allen HMG-CoA Lyase orthologen Enzymen vorhanden. Aufgrund der Beobachtung, dass die Bindestelle bildenden Reste (Asp¹⁴, His²⁰⁵, His²⁰⁷, Asn²⁴⁷), sowie die meisten ihre Interaktionspartner auch in drei anderen TIM barrel Enzymen zu finden waren, welche unterschiedliche Spaltungsreaktionen von C-C Bindungen katalysieren, wobei angenommen wird, dass diese über ein Enolat-Intermediat ablaufen (4-Hydroxy-2-ketovalerat Aldolase, 2-Isopropylmalat Synthase und Transcarboxylase 5S), wurde von den Autoren der Name "DRE-TIM Metallolyasen" für diese neu identifizierte Enzymfamilie vorgeschlagen, wobei ein gemeinsamer katalytischer Reaktionsmechanismus die invarianten Aminosäuren Asp¹⁴, Arg¹³ und Glu⁴⁴ (DRE-Triplet) erfordert. Das Asp¹⁴ bindet dabei das zweiwertige Kation, während das Arg¹³ vermutlich die Ladung im Enolat-Intermediat stabilisiert (mögliche X⁺) und das Glu⁴⁴ die genaue strukturelle Ausrichtung von Asp¹⁴ und Arg¹³ aufrechterhält. Einen weiteren wichtigen Aminosäurerest im aktiven Zentrum stellt das Cys²³⁸ dar. Dieser gegenüber dem Metallion-Cofaktor im *G-loop* liegende Rest könnte die Rolle der katalytischen Base (B⁻) im Reaktionsmechanismus übernehmen. Die Substratbindung erfolgt den Autoren nach in einer tiefen Furche in der Proteinoberfläche, wobei die negative Ladung der Carboxylatgruppe des HMG-CoA Anteils am zweiwertigen Metallion im aktiven Zentrum gebunden ist (Forouhar et al., 2006).




[A]: Monomer des Proteins aus *B. melitensis* komplexiert mit Ca^{2+} (aus Kristallisationslösung). Die β -Faltblätter sind in türkis, α -Helices in gelb, verbindende Loops in lila, Ca^{2+} in orange und der *G-loop*, sowie die Seitenketten von sechs invarianten Resten in grün dargestellt. [B]: Das Protein-Rückgrat des aktiven Zentrums ist als gelber Ring mit dem *G-loop* in orange

dargestellt. Seitenketten sind gezeigt in der Kugel-Stab Darstellung, wobei die Bindungen und die C-Atome in türkis, Sauerstoff-, Stickstoff- und Schwefel-Atome in rot, blau und dunkelgelb abgebildet sind. Die Abbildung wurde der Arbeit von Forouhar et *al.* (2006) entnommen.

Für die Reaktion der HMG-CoA Lyase sind zusammenfassend drei wichtige chemische Interaktionen erforderlich. Die erste ist dabei die Bindung der Carboxylatgruppe des HMG-CoAs **31** an das zweiwertige Metallion. Neben der Verankerung des Substrates **31** im aktiven Zentrum des Proteins stabilisiert diese Interaktion den Übergangszustand für die Spaltung durch Abziehen der Elektronen-Dichte von einem der beteiligten C-Atome. Die zweite Interaktion stellt die Ausbildung der Wasserstoffbindung des Enolat-bildenen Carbonyls zum Arg¹³ im DRE-Triplet dar, welche eine Stabilisierung der negativen Ladung zur Folge hat. Es folgt die Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindung der 3-Hydroxygruppe des HMG-CoAs **31** an ein konserviertes Cys²³⁸. Dieses fungiert den Autoren nach als die katalytische Base (B⁻, Abb. 5.18) und bewirkt das Abziehen des Protons und die Bildung der C=O Bindung, welches mit der Spaltung der C-C Bindung gekoppelt ist (Forouhar et *al.*, 2006).





Vergleicht man den Mechanismus der HMG-CoA Lyase, wie er in der Abbildung 5.18 dargestellt ist mit der Reaktion der HHG-CoA Lyase des Atu-Weges, so sind zwei denkbare Reaktionen möglich (Abb. 5.19). Bei einer Reaktion vergleichend zur HMG-CoA Lyase würde Acetyl-CoA 24 und die entsprechende Ketoverbindung 7-Methyl-30xo-6-octenoat 92 erhalten werden (Abb. 5.19, (I)). Demgegenüber würden bei der zweiten möglichen Reaktion Acetat 22 und 7-Methyl-30xo-6-octenoyl-CoA 23 entstehen (Abb. 5.19, (II)). Die letzteren Reaktionsprodukte (Reaktionsverlauf II) der Lyase Reaktion konnten dabei bereits durch Seubert & Fass (1964a) für die HHG-CoA Lyase nachgewiesen werden.



Abb. 5.19: Darstellung der möglichen Reaktionen katalysiert durch die HHG-CoA Lyase
 Dargestellt ist der mögliche Reaktionsverlauf vergleichend zur postulierten Reaktion der HMG-CoA Lyase nach Forouhar et *al.* (2006), wobei die Reaktionsprodukte der Reaktion (II) bereits durch Seubert und Fass (1964a) in der Reaktion nachgewiesen werden konnten (7-Methyl-30xo-6-octenoyl-CoA 23 und Acetat 22).
 (X⁺: positiv geladene Gruppe des konservierten Proteingerüstes; B⁻: allgemeine Base; HA: allgemeine Säure)

Um der Frage nach dem katalysierenden Enzym weiter nachzugehen, ist neben einem Nachweis der Enzymaktivität mit dem Substrat 3-Hydroxy-3-isohexenyl-glutaryl-CoA eine Struktur auch vergleichend zur HMG-CoA Lysase (LiuE) erforderlich. Hierfür wurden erste Vorarbeiten geleistet, indem das Protein AtuA aus P. aeruginosa, welches die HHG-CoA Lyase darstellen könnte, heterolog in E. coli produziert wurde und anschließend nach Reinigung über Ni-NTA Agarose für die Kristallisation zur Verfügung stand. Durch eine erfolgreiche Kristallisation könnten Strukturanalysen vorgenommen werden. Dabei wäre es möglich durch Vergleiche mit ähnlichen Proteinen wichtige Bereiche und durch gezielte Mutagenese essentielle Aminosäuren in der Struktur zu identifizieren. Auch ein möglicher Vergleich von Strukturen mit und ohne gebundenes Substrat und daraus folgend eine Identifizierung eines katalytischen Zentrums wären denkbar. Da allerdings bis zum jetztigen Zeitpunkt keine brauchbaren Kristalle vorlagen, müssen auch diese Untersuchungen in künftigen Arbeiten weiter verfolgt werden. In diesen wäre es sicherlich sinnvoll, außerdem die Struktur von LiuE aus P. aeruginosa für einen besseren Vergleich, aber auch in Hinblick auf eine durch ein unspezifisches Enzym mit breitem Substratspektrum katalysierte Reaktion aufzuklären.

5.5. high performance liquid chromatography zum Nachweis einer Carboxylase-Aktivität

Für die Besimmung von Aktivitäten der Carboxylase wurde in dieser Arbeit zunächst ein etablierter Assay (Fall, 1976; Höschle et *al.*, 2005; Förster-Fromme et *al.*, 2006) verwendet. Die Reaktion des Carboxylase-Enzyms war dabei an die Reaktion der Pyravat-Kinase (PK) und der Lactat-Dehydrogenase (LDH) gekoppelt, wobei es durch diese möglich war die Aktivität der Carboxylase optisch durch die Abnahme der Konzentration von NADH+H⁺ bei 340 nm (30 °C) zu bestimmen (Abb. 5.20).



Abb. 5.20: Bestimmung der Carboxylase-Aktivität über die Reaktionen der Pyruvat-Kinase (PK) und der Lactat-Dehydrogenase (LDH) in einen gekoppelten Assay über die Konzentrationsänderung von NADH+H⁺ bei 340 nm

Mit Hilfe des optischen Tests konnten sowohl für *P. aeruginosa* Rohextrakte als auch für die gereinigte Metyhylcrotonyl-CoA Carboxylase aus *P. aeruginosa* und *E. coli* (rekombinantes Enzym) Aktivitäten bestimmt werden. Für das gereinigte Enzym Geranyl-CoA Carboxylase war dies sowohl als natives als auch als rekombinantes Enzym nicht möglich.

Da nicht ausgeschlossen werden konnte, dass der enzymatische Assay nicht sensitiv genug für die Untersuchung der GCase-Aktivität war, sollte im Verlauf der Arbeit auch die Möglichkeit getestet werden, die Reaktion auf andere Weise zu verfolgen. Um einen Nachweis der Reaktion über HPLC zu ermöglichen, wurde zunächst getestet, ob sich verschiedene CoA-Ester über ihre Retentionszeiten getrennt darstellen lassen. Hierfür standen das CoenzymA, Acetyl-CoA, Methylcrotonyl-CoA, Citronellyl-CoA und Geranyl-CoA als Referenzen zur Verfügung. Wie bereits im Abschnitt 5.2. erwähnt, war es dabei möglich unter Verwendung des Na-Phosphatpuffersystems die Ersteren der Thioester deutlich getrennt voneinander darzustellen (Kap.4.7.1.). Citronellyl-CoA und Geranyl-CoA wiesen zwar eine Retentionszeit deutlich verschieden zu den übrigen CoA-Estern auf, jedoch war der Unterschied in lediglich einer Doppelbindung nicht groß genug, um diese beiden getrennt darzustellen.

Die Carboxylierung der Methylgruppe stellt eine signifikante Veränderung in der Struktur des Thioester-Substrates dar, sodass angenommen wurde, dass diese Veränderung in einem Signal mit einer zum eingesetzten Edukt veränderten Retentionszeit im HPLC-Chromatogramm resultieren würde (Kap.4.7.2.). Bei der Untersuchung der Geranyl-CoA Carboxylase konnten in diesem Falle aber keine eindeutigen Ergebnisse erhalten werden. Zwar trat bei Verwendung von Rohextrakt von P. aeruginosa (Cs Zellen) eine Abnahme der GCoA Signale auf, allerdings war diese Abnahme auch durch Rohextrat von Glukose Zellen zu beobachten, in welchen der Abbau nicht induziert wird. Auch das Auftreten eines neuen Signals, war nicht eindeutig, da dieses ebenfalls in einigen GCoA Proben identifiziert werden konnte. Wurde dagegen gereinigtes Wildtyp-Enzym eingesetzt, so konnte keine Abnahme des GCoA Signals beobachtet werden. Da das Isohexenyl-glutaconyl-CoA zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen noch nicht zur Verfügung stand, konnte dieses nicht als Referenz zur Identifizierung des entsprechenden Signals dienen. Um jedoch das mögliche Produkt der Reaktion dennoch nachweisen zu können, wurden die Proben auch mittels HPLC-(ESI)-MS untersucht. Während jedoch für die Probe ohne Enzym die Masse von GCoA identifiziert werden konnte, war eine Aussage bei Proben mit Enzym nicht möglich, da entweder kein CoA-Ester oder lediglich GCoA als Substrat festgestellt werden konnte. Die Masse von Isohexenylglutaconyl-CoA, dem carboxylierten Produkt der Reaktion, konnte in keinem Ansatz identifiziert werden, sodass eine Reaktion an dieser Stelle nicht nachweisbar war.

Wurde die Methylcrotonyl-CoA Carboxylase auf diese Weise untersucht, so konnte sowohl bei Verwendung von Rohextrakt von *P. aeruginosa* (Iso Zellen, Glu Zellen) als auch von gereinigtem Enzym eine Abnahme des MCoA Signals beobachtet werden. Ein neues Signal trat dagegen aber bei diesen Untersuchungen nicht in Erscheinung. Auch über die HPLC-(ESI)-MS Analyse konnte zwar das Substrat der Reaktion nicht aber das carboxylierte Produkt 3-Methyl-glutaconyl-CoA über die Masse identifiziert werden.

Obwohl die Chromatogramme der HPLC Analysen für die Unterscheidung der bekannten CoA-Ester mit Ausnahme von Citronellyl-CoA und Geranyl-CoA gut geeignet waren, zeigte sich bei der HPLC-(ESI)-MS Analyse der zum Teil starke Hintergrund als Nachteil, sodass z.B. das 3-Methyl-glutaconyl-CoA als Produkt der MCase Reaktion nicht eindeutig nachgewiesen werden konnte. Einen weiteren Aspekt stellte die Nachweisgrenze dar. Während die Reaktion der Citronellyl-CoA Dehydrogenase mit Citronellyl-CoA eindeutig über HPLC-(ESI)-MS bestätigt werden konnte, war dies für die beiden Carboxylasen nicht

möglich. Auch das Fehlen der Produkte der Carboxylase Reaktionen Isohexenyl-glutaconyl-CoA bzw. 3-Methyl-glutaconyl-CoA als Referenzen erschwerte die Untersuchung.

Da diese Verbindungen nicht zur Verfügung standen, sollte in einem anderen Versuch der Nachweis der Reaktion über die Konzentrationsänderung von ATP und ADP (siehe Abb. 5.19) getestet werden. Doch obwohl die Nukleotide ATP, ADP und AMP mittels HPLC im Chromatogramm getrennt dargestellt werden konnten und auch die Analyse der getesteten Modellreaktion der Hexokinase mit Glukose als Substrat erfolgreich war, war es im Folgenden nicht möglich die Reaktion der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase auf diesem Wege nachzuweisen (Kap.4.7.3.).

Letztendlich wurde im Abschnitt 4.7.4. eine Berechnung des Umsatzes der Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Reaktion unter zu Hilfename des optischen Assays vorgenommen. Mit einer maximalen Aktivität von 5900 mU/mg, welche aus der entsprechenden Absorptionsänderung der Reaktion berechnet wurde, und dem Lambert-Beersche Gesetz konnte eine Konzentrationsänderung von 0,006 mM und damit ein Umsatz von 0,6 % berechnet werden. Ein Umsatz in diesem Bereich ist sehr dürftig und über die durchgeführten Untersuchungen im Chromatogramm unter den hier gewählten Bedingungen scheinbar nicht zu verfolgen.

Um bessere Bedingungen zu schaffen, ist aktiveres Enzym bzw. mehr Enzym und sauberes Substrat erforderlich, um nachweisbare Mengen an Reaktionsprodukt zu generieren. Für die Analyse mittels HPLC-(ESI)-MS wären ebenfalls saubere Proben erforderlich, um den störenden Hintergrund so weit wie möglich zu reduzieren. Zum einen könnte dies durch Abstoppen der Reaktion und Präzipitierung der enthaltenen Proteine durch Zugabe von HCl erfolgen. Die Proteine könnten folgend dann durch Zentrifugation von dem zu untersuchenden Überstand abgetrennt werden. Anderseits wäre auch eine einfache Filtration der Proben wie bei Tsuchida et al. (2011) denkbar. Bei Chávez-Avilés et al. (2010) erfolgte für die Messung der HHG-CoA Lyase Aktivität die Inkubation des Reaktionsansatzes für 30 min, bevor dieser durch Zugabe von HCl (25 %) abgestoppt wurde. Präzipitierte Proteine wurde mittels Zentrifugation abgetrennt, der Überstand neutralisiert und folgend filtriert (0,22 µm Membran), bevor eine Analyse des GCoA Umsatzes über HPLC erfolgte. Bei Gande et al. (2004; Gande et al., 2007) wurde die Acetyl-CoA abhängige Malonyl-CoA Bildung via HPLC untersucht. Die Reaktionen wurden in diesem Fall durch Zugabe von Perchlorsäure (30 %) abgestoppt, die Ansätze zentrifugiert und der Überstand mit Natriumcarbonat neutralisiert und so für die HPLC Analyse eingesetzt. Eine andere Möglichkeit wäre die Festphasenextraktion. Dabei handelt es sich um eine Methode der Probenvorbereitung, wobei eine mögliche Anreicherung, Aufkonzentrierung oder Isolation eines Analyten erreicht werden kann. Die in einem Lösungsmittel gelöste, zu analysierende Komponente (Isolat) kann mit Hilfe der SPE (solid phase extraction) aus sehr verdünnten Lösungen für die eigentliche Analyse angereichert werden, indem die Probelösung durch das Sorbens geleitet wird. Während das Lösungsmittel das Sorbens ungehindert passiert, reichert sich das Isolat auf dem Sorbensbett an und kann durch ein geeignetes Lösungsmittel eluiert und anschließend weiter eingesetzt oder analysiert werden (Thurman & Mills, 1998). Diese Methode kam bei der Isolation und Quantifizierung von lang-kettigen Acyl-CoA Estern aus Hirngeweben (Deutsch et al., 1994) und Rattenleber (Hosokawa et al., 1986; Elholm et al., 2000), sowie bei der Untersuchung von CoA-Estern aus Peroxisomen (Gan-Schreier et al., 2005) zum Einsatz. Eine Methode zur Extraktion von kurz- und lang-kettigen Acyl-CoA Estern aus Geweben und anschließender Analyse über reverse-phase HPLC wurde dagegen von Rosendal und Knudsen (1992) beschrieben. Diese beruht auf einer Zwei-Phasen Chloroform/Methanol/ Wasser Extraktion um Fette zu entfernen, gefolgt von einer Extraktion der lang-kettigen Acyl-CoA Ester aus der proteinhaltigen Interphase. Lang-kettige Acyl-CoA Ester wurden dabei unter Verwendung von Methanol und hohen Salzkonzentrationen (2 mM Ammoniumacetat) extrahiert. Bei Wagner (2008) und Scharnewski (2009) erfolgte eine Untersuchung von Acyl-CoA Estern mittels HPLC nach Larson und Graham (2001), wobei die aus biologischen Proben gewonnenen CoA-Ester in fluoreszierende Acyl-etheno-CoA Ester überführt wurden. Die Extraktion von Acyl-CoA Estern aus S. cerevisiae erfolgte in diesen Arbeiten modifiziert nach Rosendal und Knudsen (1992), nachdem zunächst der Zellaufschluss mittels Glasperlen und Zugabe von Wasser und Chloroform/Methanol (2:1, v/v), sowie intensivem Schütteln erreicht wurde. Nach erneuter Zugabe von Chloroform und dest. Wasser wurden die entsprechenden Proben erneut stark geschüttelt und folgend zentrifugiert. Nach Phasen-trennung erfolgte die Entnahme der Ober- und Unterphase und folgend das Trocknen der Acyl-CoA haltigen Interphase. Die Extraktion der CoA-Ester erfolgte anschließend durch Zugabe von Extraktionspuffer (2 ml Isopropanol; 2 ml KH₂PO₄ (50 mM) pH 7,2; 50 µl Essigsäure; 80 µl BSA (50 mg/ml, entfettet)), gesättigter Ammoniumsulfatlösung und Chloroform/ Methanol (1:2, v/v), kräftigem Schütteln für mindestens drei Minuten, einer Inkubation für 20 min bei RT und folgend einer Zentrifugation. Der erhaltene Überstand wurde getrocknet und zur Derivatisierung eingesetzt. Für die Derivatisierung der Adenineinheit des CoenzymAs (148) der Proben zu den Etheno-Derivaten (Abb. 5.21, 162) wurden die isolierten Thioester mit dem Derivatisierungsreagenz (500 mM Chloracetaldehyd; 150 mM Citratpuffer pH 4,0; 0,5 % (w/v) SDS) bei 85 °C für 30 min inkubiert. Nach Abkühlen der Proben (mind. 30 min, 4 °C) waren diese einsatzbereit für die entsprechende HPLC-Analyse. Die Elution der Acyl-*etheno*-CoA-Ester von der Säule (LUNA 150 x 2,0 mm (Phenomenex, Aschaffenburg)) erfolgte unter alkalischen Bedingungen in der Gegenwart von Triethylamin unter Nutzung eines quaternären Pumpensystems, wobei die *Etheno*-Thioester mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors (Anregungswellenlänge: 230 nm, Emissionswellenlänge: 420 nm) verfolgt wurden.



Abb. 5.21: Derivatisierung der Adenineinheit des CoenzymAs 147 zu N6-*Etheno*-CoenzymA 161 als Bespiel für die Modifizierung der Acyl-CoA Ester für die HPLC Analyse und Detektion mittels Fluoreszenzdetektor nach Larson & Graham, 2001

Letztendlich muss versucht werden die CoA-Ester Produkte der Carboxylase Reaktionen Isohexenyl-glutaconyl-CoA (Geranyl-CoA Carboxylase) und 3-Methyl-glutaconyl-CoA (Methylcrotonyl-CoA Carboxylase) in ausreichenden Mengen bereitzustellen, um sie über den optischen Test bzw. über HPLC detektieren zu können. Um ausreichend Enzym für diese Arbeiten bereitstellen zu können, wurde versucht rekombinantes Enzym zu erhalten (Kap.5.3.2.). Stünde auch ausreichend Substrat für die Reaktion zu Verfügung, so wäre es vielleicht auch möglich diese Produkte nachzuweisen. Allerdings konnte in dieser Arbeit lediglich ein aktives MCase Enzym aus *E. coli* gewonnen werden. Das entsprechend rekombinante GCase Enzym zeigte unter den hier gewählten Bedingungen keine Aktivität (Kap.5.4.2.). Die Analyse der Enzymreaktion der rekombinanten MCase erfolgte jedoch aus

Zeitgründen nur noch über den optischen Test, sodass eine Analyse mittels HPLC bzw. HPLC-(ESI)-MS noch aussteht. Trotzdem, auch wenn das rekombinante Protein im Vergleich zum Wildtypenzym schnell und sauber in guten Mengen erhalten werden kann, so muss doch über eine mögliche Anreichung bzw. Isolierung der CoA-Ester aus den Enzymansätzen nachgedacht werden. Einige mögliche Ansätze hierfür wurden im letzten Abschnitt besprochen. Nichtsdestotrotz wäre es sinnvoll, sowohl die Produkte der Carboxylase Reaktionen, als auch die Intermediate der sich anschließenden Enzyme in den Händen zu halten. Diese könnten als Referenzverbindungen in der HPLC Analyse dienen, sodass neue Signale im Chromatogramm gegebenenfalls schneller und besser zugeordnet werden könnten. Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung wäre eine Analyse der Proben mittels Gaschromatographie (Metabolitanalyse). Vorstufen einiger Verbindungen des "lower atu pathways" stehen dank der Arbeiten am Institut für Organische Chemie als Methylester zur Verfügung (Geranylsäuremethylester 115, der entsprechende carboxylierte Geranylsäuremethylester 125 und der 7-Methyl-3-oxo-oct-6-ensäure-methylester 133) und könnten in diesem Falle als mögliche Referenzen eingesetzt werden. Eine Analyse von Intermediaten in P. aeruginosa wäre denkbar, indem diese über saure Methanolyse (Brandl et al. 1988; Timm & Steinbüchel, 1990; Miquel & Browse, 1992; Wagner, 2008) in Carbonsäuremethylester überführt werden, wobei gewaschende Zellsedimente aus entsprechend induzierten Kulturen als Ausgangsmaterial dienen könnten. Die Derivatisierung könnte vergleichend zu Wagner (2008) durch Inkubation der Proben in FAMES-Lösung (2,75 % (v/v) Schwefelsäure (95-97 %), 2 % (v/v) Dimethoxypropan, ad Methanol) für eine Stunde bei 80 °C in einem Wasserbad schüttelnd erfolgen. Nach Abkühlen der Proben auf RT würde die Reaktion durch Zugabe von 5 M NaCl gestoppt und die Methylester könnten mit *n*-Hexan extrahiert werden. Nach Trocknung der Methylester enthaltenden organischen Phase könnten die Proben in Acetonitril aufgenommen werden und stünden einer gaschromatographischen Analyse zur Verfügung.

6. Literaturverzeichnis

Adams, R., and van Duuren, B. L. (1953): Dicrotaline. The structure and synthesis of dicrotalic acid. *J. Am. Chem. Soc.*, 75(10): 2377-2379.

Agnihotri, G., and Liu, H.-W. (2003): Enoyl-CoA hydratase. Reaction, mechanism, and inhibition. *Bioorg. Med. Chem.*, 11(1): 9-20.

Aguilar, J. A., Zavala, A. N., Díaz-Pérez, C., Cervantes, C., Díaz-Pérez, A. L., and Campos-García, J. (2006): The *atu* and *liu* clusters are involved in the catabolic pathways for acyclic monoterpenes and leucine in *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Environ Microbiol*, 72(3): 2070-2079.

Aguilar, J. A., Díaz-Pérez, C, Díaz-Pérez, A. L., Rodríguez-Zavala, J. S., Nikolau, B. J., and Campos-García, J. (2008): Substrate specificity of the 3-methylcrotonylcoenzyme A (CoA) and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.*, 190(14): 4888-4893.

Alban, A., Baldet, P., Axiotis, S., and Douce, R. (1993): Purification and characterization of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase from higher plant mitochondria. *Plant Physiol.*, 102(3): 957-965.

Albermann, C., Ghanegaonkar, S., Lemuth, K., Vallon, T., Reuss, M., Armbruster, W., and Sprenger, G. A. (2008): Biosynthesis of the vitamin E compound delta-tocotrienol in recombinant *Escherichia coli* cells. *Chembiochem*, 9(15): 2524-2533.

Albermann. C., Trachtmann, N., and Sprenger, G. A. (2010): A simple and reliable method to conduct and monitor expression cassette integration into the *Escherichia coli* chromosome. *Biotechnol J.*, 5(1): 32-38.

Albermann, C. (2011): High versus low level expression of the lycopene biosynthesis genes from *Pantoea ananatis* in *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett.*, 33(2): 313-319.

Alberts, A. W., and Vagelos, P. R. (1972): Acyl-CoA carboxylases. In: The *Enzymes* (Boyer, P. D., ed), 6: 37-82, 3rd Ed, Academic Press, New York

Al-Feel, W., Chirala, S. S., and Wakil, S. J. (1992): Cloning of the yeast *FAS3* gene and primary structure of yeast acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89(10): 4534-4538.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.*, 215(3): 403-410.

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25(17): 3389-3402.

Alves, J., Westling, L., Peters, E. C., Harris, J. L., and Trauger, J. W. (2011): Cloning, expression, and enzymatic activity of *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* acetyl-coenzyme A carboxylases. *Anal Biochem.*, 417(1): 103-111.

Arent, S., Christensen, C. E., Pye, V. E., Nørgaard, A., and Henriksen, A. (2010): The multifunctional protein in peroxisomal beta-oxidation: structure and substrate specificity of the *Arabidopsis thaliana* protein MFP2. *J Biol Chem.*, 285(31): 24066-24077.

Armstrong, J. M. (1964): The molar extinction coefficient of 2,6-dichlorphenol indophenol. *Biochim Biophys Acta.*, 86: 194-197.

Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M. (2008): Biological effects of essential oils – a review. *Food Chem Toxicol.*, 46(2): 446-475.

Baldet, P., Alban, C., Axiotis, S., and Douce, R. (1992): Characterisation of biotin and 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase in higher plant mitochondria. *Plant Physiol.*, 99(2): 450-455.

Beckman, D. L., and Kranz, R. G. (1991): A bacterial homolog to the mitochondrial enoyl-CoA hydratase. *Gene*, 107(1): 171-172.

Best, E. A., and Knauf, V. C. (1993): Organization and nucleotide sequences of the genes encoding the biotin carboxyl carrier protein and biotin carboxylase protein of *Pseudomonas aeruginosa* acetyl coenzyme A carboxylase. *J Bacteriol.*, 175(21): 6881-6889.

Blanchard, C. Z., and Waldrop, G. L. (1998): Overexpression and kinetic characterization of the carboxyltransferase domain component of acetyl-CoA carboxylase. *J Bio Chem.*, 273(30): 19140-19145.

Bott, M., Pfister, K., Burda, P., Kalbermatter, O., Woehlke, G., and Dimroth, P. (1997): Methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Propionigenium modestum* - cloning and sequencing of the structural genes and purification of the enzyme complex. *Eur J Biochem.*, 250(2): 590-599.

Boudjouk, P., Thompson, D. P., Ohrbom, W. H., and Han, B.-H. (1986): Effects of ultrasonic waves on the generation and reactivities of some metal powders. *Organometallics*, 5(6): 1257-1260.

Bradford, M. M. (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.

Bramwell, H., Hunter, I. S., Coggins, J. R., and Nimmo, H. G. (1996): Propionyl-CoA carboxylase from *Streptomyces coelicolor* A3(2): cloning of the gene encoding the biotin-containing subunit. *Microbiology*, 142(Pt 3): 649-655.

Brandl, H., Gross, R. A., Lenz, R. W., and Fuller, R. C. (1988): *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly(β-hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl Environ Microbiol.*, 54(8): 1977-1982.

Braun, M.; Teichert, O., and Zweck, A. (2006): Übersichtsstudie Biokatalyse in der industriellen Produktion – Fakten und Potentiale zur weißen Biotechnologie. Zukünftige Technologien Consulting (ZTC) der VDI Technologiezentrum GmbH, Düsseldorf

Braune, A., Bendrat, K., Rospert, S., and Buckel, W. (1999): The sodium ion translocating glutaconyl-CoA decarboxylase from *Acidaminococcus fermentans*: cloning and function of the genes forming a second operon. *Molecular Microbiology*, 31(2): 473-487.

Breitmaier, E. (1999): Terpene – Aromen, Düfte, Pharmaka, Pheromone, 1. Auflage B. G. Teubner Stuttgart, Leipzig 1999, ISBN 3-519-03548-0.

Brückner, R. (2004): Reaktionsmechanismen. Organische Reaktionen, Stereochemie, Moderne Synthesemethoden. 3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, ISBN: 3-8274-1579-9.

Brückner, R., Braukmüller, S., Beckhaus, H. D., Dirksen, J., Göppel, D., and Oestreich, M. (2008): Praktikum Präparative Organische Chemie. Bd.1 Organisch-Chemisches Grundpraktikum. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, ISBN: 978-3-8274-1505-9.

Buddrus, J. (2003): Grundlagen der Organischen Chemie, 3. Auflage, Walther de Gruyter GmbH & CoKG Berlin, ISBN 3-11-014683-5.

Buettner, H. (1988): Studies on enzymes of fatty acid beta-oxidation. PhD Thesis, University of Konstanz. 1989, 1. Aufl., Konstanzer Dissertationen, ISBN 9783891913048, Band 253.

Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) (2008): Weiße Biotechnologie – Chancen für neue Produkte und umweltschonende Prozesse. BMBF, Referat Biotechnologie, Berlin.

Burke, Y. D., Stark, M. J., Roach, S. L., Sen, S. E., and Crowell, P. L. (1997): Inhibition of pancreatic cancer growth by the dietary ioprenoids farnesol and geraniol. *Lipids.*, 32(2): 151-156.

Burke, Y. D., Ayoubi, A. S., Werner, S. R., McFarland, B. C., Heilmann, D. K., Ruggeri, B. A., and Crowell, P. L. (2002): Effects of the isoprenoids perillyl alcohol and farnesol on apoptosis biomarkers in pancreatic cancer chemoprevention. *Anticancer Res.*, 22(6A): 3127-3134.

Cantwell, S. G., Lau, E. P., Watt, D. S., and Fall, R. R. (1978): Biodegradation of acyclic isoprenoids by *Pseudomonas species*. *J Bacteriol.*, 135(2): 324-333.

Carnesecchi, S., Langley, K., Exinger, F., Gosse, F., and Raul, F. (2002a): Geraniol, a component of plant essential oils, sensitizes human colonic cancer cells to 5-Fluorouracil treatment. *J Pharmacol Exp Ther.*, 301(2): 625-630.

Carnesecchi, S., Bradaia, A., Fisher, B., Coelho, D., Scholler-Giunard, M., Gosse, F., and Raul, F. (2002b): Perturbation by geraniol of cell membrane permeability and signal transduction pathways in human colon cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther.*, 303(2): 711-715.

Carnesecchi, S., Bras-Goncavales, R., Bradaia, A., Zeisel, M., Gosse, F., Poupon, M. F., and Raul, F. (2004): Geraniol, a component of plant essential oils, modulates DNA synthesis and potentiates 5-fluorouracil efficacy on human colon tumor xenografts. *Cancer Lett.*, 215(1): 53-59.

Carpenter. K., Pollitt, R. J., and Middleton, B. (1992): Human liver long-chain 3-hydroxyacylcoenzyme A dehydrogenase is a multifunctional membrane-bound beta-oxidation enzyme of mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun.*, 183(2): 443-448.

Carroll, M. F., and Bader, A. R. (1953): The reactions of diketene with ketones. *J Am Chem Soc.*, 75(21): 5400-5402.

Casals, N., Gómez-Puertas, P., Pié, J., Mir, C., Roca, R., Puisac, B., Aledo, R., Clotet, J., Menao, S., Serra, D., Asins, G., Till, J., Elias-Jones, A. C., Cresto, J. C., Chamoles, N. A., Abdenur, J. E., Mayatepek, E., Besley, G., Valencia, A., and Hegardt, F. G. (2003): Structural ($\beta\alpha$)₈ TIM barrel model of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase. *J Biol Chem.*, 278(31): 29016-29023.

Cervello, J., Marquet, J., and Moreno-Manas, M. (1987a): Cobalt mediated regioselective alkylation of methyl 3,5-dioxohexanoate. Preparation of 5-alkyl derivatives of 4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone. *J Chem Soc., Chem Commun.*, 9: 644-645.

Cervello, J., Marquet, J., and Moreno-Manas, M. (1987b): Copper complex protection in the regioselective alkylation of methyl 3,5-dioxohexanoate. Preparation of 3-alkyl derivatives of 4-hydroxy-6-methyl-2-pyrone. *Tetrahedron Letters*, 28(32): 3715-3716.

Chang, M. C. Y., and Keasling, J. D. (2006): Production of isoprenoid pharmaceuticals by engineered microbes. *Nat Chem Biol.*, 2(12): 674-681.

Chattopadhyay, A. (2007): Biochemische Untersuchung der Acyl-CoA Dehydrogenasen im Citronellol-Stoffwechsel. Studienarbeit, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart

Chattopadhyay, A., Förster-Fromme, K., and Jendrossek, D. (2010): PQQ-dependent alcohol dehydrogenase (QEDH) of *Pseudomonas aeruginosa* is involved in catabolism of acyclic terpenes. *J Basic Microbiol.*, 50(2): 119-24.

Chávez-Avilés, M., Díaz-Pérez, A. L., Reyes-de la Cruz, H., and Campos-García, J. (2009): The *Pseudomonas aeruginosa liuE* gene encodes the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A lyase, involved in leucine and acyclic terpene catabolism. *FEMS Microbiol Lett.*, 296(1): 117-123.

Chávez-Avilés, M., Díaz-Pérez, A. L., and Campos-García, J. (2010): The bifunctional role of LiuE from *Pseudomonas aeruginosa*, displays additionally HIHG-CoA lyase enzymatic activity. *Mol Biol Rep.*, 37(4): 1787-1791.

Che, P., Weaver, L. M., Wurtele, E. S., and Nikolau, B. J. (2003): The role of biotin in regulating 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 131(3): 1479-1486.

Chen, Y., Wurtele, E. S., Wang, X., and Nikolau, B. J. (1993): Purification and characterization of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase from somatic embryos of *Daucus carota*. *Arch Biochem Biophys.*, 305(1): 103-109.

Chuakrut, S., Arai, H., Ishii, M., and Igarashi, Y. (2003): Characterization of a bifunctional archaeal acyl coenzyme A carboxylase. *J Bacteriol.*, 185(3): 938-947.

Chung, C. T., Niemela, S. L., and Miller, R. H. (1989): One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *PNAS USA*, 86(7): 2172-2175.

Cocker, W., Geraghty, N. W. A., McMurry, T. B. H., and Shannon, P. V. R. (1984): An investigation of the thermal decomposition of the methohydroxides and methodeuterio-oxides of some 5-N,N-dimethylaminopent-1-enes. *J Chem Soc Perkin Trans. I*, 2245-2254.

Coon, M. J., Robinson, W. G., and Bachhawat, B. K. (1955): Enzymatic studies on the biological degradation of the branched chain amino acids. In: McElroy, W. D., and Glass, B. (eds.): A symposium on amino acid metabolism. Baltimore: Johns Hopkins Press, 431-441.

Dakoji, S., Li, D., Agnihotri, G., Zhou, H. Q., and Liu, H. W. (2001): Studies on the inactivation of bovine liver enoyl-CoA hydratase by (methylenecyclopropyl)formyl-CoA: elucidation of the inactivation mechanism and identification of cysteine-114 as the entrapped nucleophile. *J Am Chem Soc.*, 123(40): 9749-9759.

Daniel, J., Oh, T.-J., Lee, C.-M., and Kolattukudy, P. E. (2007): AccD6, a member of the Fas II locus, is a functional carboxyltransferase subunit of the acyl-coenzyme A carboxylase in *Mycobacterium tuberculosis. J Bacteriol.*, 189(3): 911-917.

DECHEMA (2004): Weiße Biotechnologie: Chancen für Deutschland. Positionspapier der Dechema e.V., Gesellschaft für Chemische Technik und Biotechnologie e. V., Frankfurt am Main

Deutsch, J., Grange, E., Rapoport, S. I., and Purdon, A. D. (1994): Isolation and quantitation of long-chain acyl-coenzyme A esters in brain tissue by solid-phase extraction. *Anal Biochem.*, 220(2): 321-323.

Diacovich, L., Peirú, S., Kurth, D., Rodríguez, E., Podestá, F., Khosla, C., and Gramajo, H. (2002): Kinetic and structural analysis of a new group of acyl-CoA carboxylases found in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *J Biol Chem.*, 277(34): 31228-31236.

Díaz-Pérez, A. L., Zavala-Hernandez, A. N., Cervantes, C., and Campos-García, J. (2004): The *gnyRDBHAL* cluster is involved in acyclic isoprenoid degradation in *Pseudomonas aeruginosa. Appl Environ Microbiol.*, 70(9): 5102-5110.

Díaz-Pérez, A. L., Román-Doval, C., Díaz-Pérez, C., Cervantes, C., Sosa-Aguirre, C. R., López-Meza, J. E., and Campos-García, J. (2007): Identification of the *aceA* gene encoding isocitrate lyase required for the growth of *Pseudomonas aeruginosa* on acetate, acyclic terpenes and leucine. *FEMS Microbiol Lett.*, 269(2): 309-316.

Diez, T. A., Wurtele, E. S., and Nikolau, B. J. (1994): Purification and characterization of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase from leaves of *zea mays*. *Arch Biochem Biophys.*, 310(1): 64-75.

Dimroth, P. (1987): Sodium ion transport decarboxylases and other aspects of sodium ion cycling in bacteria. *Microbiol Rev.*, 51(3): 320-340.

DiRusso, C. C. (1990): Primary sequence of the *Escherichia coli fadBA* operon, encoding the fatty acid-oxidizing multienzyme complex, indicates a high degree of homology to eucaryotic enzymes. *J Bacteriol.*, 172(11): 6459-6468.

Doi, Y., Kitamura, S., and Abe, H. (1995): Microbial synthesis and characterization of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate). *Macromolecules*, 28(14): 4822-4828.

Dueholm, M. S., Petersen, S. V., Sønderkær, M., Larsen, P., Christiansen, G., Hein, K. L., Enghild, J. J., Nielsen, J. L., Nielsen, K. L., Nielsen, P. H., and Otzen, D. E. (2010): Functional amyloid in *Pseudomonas*. *Mol Microbiol.*, 77(4): 1009-1020.

Duncan, R. E., Lau, D., El-Sohemy, A., and Archer, M. C. (2004): Geraniol and beta-ionone inhibit proliferation, cell cycle progression, and cyclin-dependent kinase 2 activity in MCF-7 breast cancer cells independent of effects on HMG-CoA reductase activity. *Biochem Pharmacol.*, 68(9): 1739-1747.

Dunn, M. F., Araíza, G., and Finan, T. M. (2001): Cloning and characterization of the pyruvate carboxylase from *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Arch Microbiol.*, 176(5): 355-363.

Elholm, M., Garras, A., Neve, S., Tornehave, D., Lund, T. B., Skorve, J., Flatmark, T., Kristiansen, K., and Berge, R. K. (2000): Long-chain acyl-CoA esters and acyl-CoA binding protein are present in the nucleus of rat liver cells. *J Lipid Res.*, 41(4): 538-545.

Engel, P. C. (1981): Butyryl-CoA dehydrogenase from *Megasphera elsdenii*. *Methods Enzymol.*, 71: 494-508.

Engel, C. K., Mathieu, M., Zeelen, J. P., Hiltunen, J. K., and Wierenga, R. K. (1996): Crystal structure of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase at 2.5 Å resolution: a spiral fold defines the CoA-binding pocket. *EMBO J.*, 15(19): 5135-5145.

Engel, C. K., Kiema, T. R., Hiltunen, J. K., and Wierenga, R. K. (1998): The crystal structure of enoyl-CoA hydratase complexed with octanoyl-CoA reveals the structural adaptations required for binding of a long chain fatty acid-CoA molecule. *J Mol Biol.*, 275(5): 847-859.

Fall, R. R. (1976): Stabilization of an acetyl-coenzyme A carboxylase complex from *Pseudomonas citronellolis*. *Biochim Biophys Acta.*, 450(3): 475-480.

Fall, R. R. (1981): 3-Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas citronellolis*. *Methods Enzymol.*, 71(Part C): 791-799.

Fall, R. R., and Hector, M. L. (1977): Acyl-coenzyme A carboxylases. Homologous 3-methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases from *Pseudomonas citronellolis*. *Biochemistry*, 16(18): 4000-4005.

Fall, R. R, Brown, J. L., and Schaeffer, T. L. (1979): Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Appl Environ Microbiol.*, 38(4): 715-722.

Feil, C. (2006): Biochemie des anaeroben Toluol-Stoffwechsels von *Thauera aromatica*. Dissertation, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Technische Hochschule Darmstadt

Festel, G. (2006): Economic potentials and market strategies in the field of industrial (white) biotechnology. Workshop "White Biotechnology", Universität Potsdam, Potsdam 6 Juli 2006.

Fong, J. C., and Schulz, H. (1977): Purification and properties of pig heart crotonase and the presence of short chain and long chain enoyl coenzyme A hydratases in pig and guinea pig tissues. *J Biol Chem.*, 252(2): 542-547.

Fong, J. C., and Schulz, H. (1981): Short chain and long chain enoyl-CoA hydratase from pig heart muscle. *Methods Enzymol.*, 71(Pt C): 390-398.

Forouhar, F., Hussain, M., Farid, R., Benach, J., Abashidze, M., Edstrom, W. C., Vorobiev, S. M., Xiao, R., Acton, T. B., Fu, Z., Kim, J.-J., Miziorko, H. M., Montelione, G. T., and Hunt, J. F. (2006): Crystal structures of two bacterial 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyases suggest a common catalytic mechanism among a family of TIM barrel metalloenzymes cleaving carbon-carbon bonds. *J Biol Chem.*, 281(11): 7533-7545.

Förster-Fromme, K., and Jendrossek, D. (2005): Malate:quinone oxidoreductase (MqoB) is required for growth on acetate and linear terpenes in *Pseudomonas citronellolis. FEMS Microbiol Lett.*, 246(1): 25-31.

Förster-Fromme, K., Höschle, B., Mack, C., Bott, M., Armbruster, W., and Jendrossek, D. (2006): Identification of genes and proteins necessary for catabolism of acyclic terpenes and leucine/isovalerate in *Pseudomonas aeruginosa. Appl Environ Microbiol.*, 72(7): 4819-4828.

Förster-Fromme, K., and Jendrossek, D. (2006): Identification and characterization of the acyclic terpene utilization gene cluster of *Pseudomonas citronellolis*. *FEMS Microbiol Lett.*, 264(2): 220-225.

Förster-Fromme, K., (2008): Der Citronellolstoffwechsel in Pseudomonaden – Funktionelle Zuordnung beteiligter Gene und deren Produkte. Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart

Förster-Fromme, K., and Jendrossek, D. (2008): Biochemical characterization of isovaleryl-CoA dehydrogenase (LiuA) of *Pseudomonas aeruginosa* and the importance of *liu* genes for a functional catabolic pathway of methyl-branched compounds. *FEMS Microbiol Lett.*, 286(1): 78-84.

Förster-Fromme, K., Chattopadhyay, A., and Jendrossek, D. (2008): Biochemical characterization of AtuD from *Pseudomonas aeruginosa*, the first member of a new subgroup of acyl-CoA dehydrogenases with specificity for citronellyl-CoA. *Microbiology*, 154(Pt 3): 789-796.

Förster-Fromme, K., and Jendrossek, D. (2010a): AtuR is a repressor of acyclic terpene utilization (Atu) gene cluster expression and specifically binds to two 13 bp inverted repeat sequences of the *atuA-atuR* intergenic region. *FEMS Microbiol Lett.*, 308(2): 166-174.

Förster-Fromme, K., and Jendrossek, D. (2010b): Catabolism of citronellol and related acyclic terpenoids in *pseudomonads*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 87(3): 859-869.

Fu, Z., Runquist, J. A., Forouhar, F., Hussain, M., Hunt, J. F., Miziorko, H. M., and Kim, J.-J. (2006): Crystal structure of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase: insights into catalysis and the molecular basis for hydroxymethylglutaric aciduria. *J Biol Chem.*, 281(11): 7526-7532.

Fukui, T., and Doi, Y. (1997): Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-*co*-3-hydroxybexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. *J Bacteriol.*, 179(15): 4821-4830.

Fukui, T., Shiomi, N., and Doi, Y. (1998): Expression and characterization of (*R*)-specific enoylcoenzyme A hydratase involved in polyhydroxyalkanoate biosynthesis by *Aeromonas caviae*. *J Bacteriol.*, 180(3): 667-673.

Furuta, S., Miyazawa, S., Osumi, T., Hashimoto, T., and Ui, N. (1980): Properties of mitochondrial and peroxisomal enoyl-CoA hydratases from rat liver. *J Biochem.*, 88(4): 1059-1070.

Gande, R., Gibson, K. J., Brown, A. K., Krumbach, K., Dover, L. G., Sahm, H., Shioyama, S., Oikawa, T., Besra, G. S., and Eggeling, L. (2004): Acyl-CoA carboxylases (*accD2* and *accD3*), together with a unique polyketide synthase (*Cg-pks*), are key to mycolic acid biosynthesis in *Corynebacterianeae* such as *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem., 279(43): 44847-44857.

Gande, R., Dover, L. G., Krumbach, K., Besra, G. S., Sahm, H., Oikawa, T., and Eggeling, L. (2007): The two carboxylases of *Corynebacterium glutamicum* essential for fatty acid and mycolic acid synthesis. *J Bacteriol.*, 189(14): 5257-5264.

Ghisla, S., and Thorpe, C. (2004): Acyl-CoA dehydrogenases. A mechanistic overview. *Eur J Biochem.*, 271(3): 220-225.

Gibson, K. M., Breuer, J., and Nyhan, W. L. (1988): 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: review of 18 reported patients. *Eur J Pediatr.*, 148(3): 180-186.

Graalfs, H., Fröhlich, R., Wolff, C., and Mattay, J. (1999): Diastereoselective addition of radicals to chiral 1,3-dioxin-4-ones. *European Journal of Organic Chemistry.*, 5: 1057-1073.

Gan-Schreier, H, Okun, J. G., Kohlmueller, D., Langhans, C.-D., Peters, V., Ten Brink, H. J., Verhoeven, N. M., Jakobs, C., Voelkl, A., and Hoffmann, G. F. (2005): Measurement of bile acid CoA esters by high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS). *J Mass Spectrom.*, 40(7): 882-889.

Gröger, H., May, O., Werner, H., Menzel, A., and Altenbuchner, J. (2006): A "second generationprocess" for the synthesis of *L*-neopentylglycine: asymmetric reductive amination using a recombinant whole cell catalyst. *Org Proc Res Developm.*, 10: 666-669.

Gröger , H., Chamouleau, F., Orologas, N., Rollmann, C., Drauz, K., Hummel, W., Weckbecker, A., and May, O. (2006): Enantioselektive Ketonreduktion mit "Designer-Zellen" bei hohen Substratkonzentrationen: Hocheffizienter Zugang zu funktionalisierten optisch aktiven Alkoholen. *Angew. Chem.*, 118: 5806-5809; *Angew. Chem. Int. Ed.* 45: 5677-5681.

Guan, X., Diez, T., Prasad, T. K., Nikolau, B. J., and Wurtele, E. S. (1999): Geranoyl-CoA carboxylase: a novel biotin-containing enzyme in plants. *Arch Biochem Biophys.*, 362(1): 12-21.

Guchhait, R. B., Polakis, S. E., Dimroth, P., Stoll, E., Moss, J., and Lane, M. D. (1974): Acetyl coenzyme A carboxylase system of *Escherichia coli*. Purification and properties of the biotin carboxylase, carboxyltransferase, and carboxyl carrier protein components. *J Biol Chem.*, 249(20): 6633-6645.

Halarnkar, P. P., and Blomquist, G. J. (1989): Comparative aspects of propionate metabolism. *Comp Biochem Physiol B.*, 92(2): 227-231.

Hammer, K. A., Carson, C. F., and Riley, T. V. (1999): Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *J Appl Microbiol.*, 86(6): 985-990.

Handrick, R., Reinhardt, S., Schultheiss, D., Reichart, T., Schuler, D., Jendrossek, V., and Jendrossek, D. (2004): Unraveling the function of the *Rhodospirillum rubrum* activator of polyhydroxybutyrate (PHB) degradation: the activator is a PHB-granule-bound protein (phasin). *J Bacteriol.*, 186(8): 2466-2475.

Hauptmann, S. (1991): Reaktion und Mechanismus in der organischen Chemie. Auflage 1, Teubner Verlag Stuttgart, 161-162, ISBN 3-519-03515-4.

He, X.-Y., Yang, S.-Y., and Schulz, H. (1989): Assay of *L*-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase with substrates of different chain lengths. *Anal Biochem.*, 180(1): 105-109.

Hector, M. L., and Fall, R. R. (1976a): Evidence for distinct 3-methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases in *Pseudomonas citronellolis*. *Biochem Biophys Res Commun.*, 71(3): 746-753.

Hector, M. L., and Fall, R. R. (1976b): Multiple acyl-coenzyme A carboxylases in *Pseudomonas citronellolis*. *Biochemistry*., 15(16): 3465-3472.

Holden, H. M., Benning, M. M., Haller, T., and Gerlt, J. A. (2001): The crotonase superfamily: divergently related enzymes that catalyze different reactions involving acyl coenzyme a thioesters. *Acc Chem Res.*, 34(2): 145-157.

Holland, P. C., Senior, A. E., and Sherratt, H. S. (1973): Biochemical effects of the hypoglycaemic compound pent-4-enoic acid and related non-hypoglycaemic fatty acids. Effects of their coenzyme A esters on enzymes of fatty acid oxidation. *Biochem J.*, 136(1): 173-184.

Holtzapple, E., and Schmidt-Dannert, C. (2007): Biosynthesis of isoprenoid wax ester in *Marinobacter hydrocarbonoclasticus* DSM 8798: identification and characterization of isoprenoid coenzyme A synthetase and wax ester synthases. *J Bacteriol.*, 189(10): 3804-3812.

Holzwarth, M. (2008): Untersuchungen zur ringgrößenselektiven, Eisen-katalysierten Cyclisierung. Diplomarbeit, Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart

Holzwarth, M., Dieskau, A., Belger, C., and Plietker, B.: Concepts for a sustainable metal catalysis. Manuskript in Vorbereitung

Horecker, B. L., and Kornberg, A. (1948): The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J Biol Chem.*, 175(1): 385-390.

Höschle, B., and Jendrossek, D. (2005): Utilization of geraniol is dependent on molybdenum in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for different metabolic routes for oxidation of geraniol and citronellol. *Microbiology*, 151(Pt 7): 2277-2283.

Höschle, B., Gnau, V., and Jendrossek, D. (2005): Methylcrotonyl-CoA and geranyl-CoA carboxylases are involved in leucine/isovalerate utilization (Liu) and acyclic terpene utilization (Atu), and are encoded by *liuB/liuD* and *atuC/atuF*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, 151(Pt 11): 3649-3656.

Höschle, B. (2006): Identifizierung zweier Gencluster (*atuABCDEFGH*, *liuRABCDE*) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 und deren funktionelle Analyse im Metabolismus methylverzweigter Verbindungen. Dissertation, Institut für Mikrobiologie, Universität Stuttgart

Hosokawa, Y., Shimomura, Y., Harris, R. A., and Ozawa, T. (1986): Determination of short-chain acyl-coenzyme A esters by high performance liquid chromatography. *Anal Biochem.*, 153(1): 45-49.

Hou, S. (2003): Highly efficient, general procedure for the preparation of alkylzinc reagents from unactivated alkyl bromides and chlorides. *Organic Letters*, 5(4): 423-425.

Hruz, P. W., and Miziorko, H. M. (1992): Avian 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase: sensitivity of enzyme activity to thiol/disulfide exchange and identification of proximal reactive cysteines. *Protein Sci.*, 1(9): 1144-1153.

Hruz, P. W., Anderson, V. E., and Miziorko, H. M. (1993): 3-Hydroxy-3-methylglutaryldithio-CoA: utility of an alternative substrate in elucidation of a role for HMG-CoA lyase's cation activator. *Biochim Biophys Acta*, 1162(1-2), 149-154.

Huder, J. B., and Dimroth, P. (1993): Sequence of the sodium ion pump methylmalonyl-CoA decarboxylase from *Veillonella parvula*. *J Biol Chem.*, 268(33): 24564-24571.

Huijberts, G. N., de Rijk, T. C., de Waard, P., and Eggink, G. (1994): ¹³C nuclear magnetic resonance studies of *Pseudomonas putida* fatty acid metabolic routes involved in poly(3-hydroxyalkanoate) synthesis. *J Bacteriol.*, 176(6): 1661-1666.

Huisman, G. W., de Leeuw, O., Eggink, G., and Witholt, B. (1989): Synthesis of poly-3-hydroxyalkanoates is a common feature of fuorescent *pseudomonads*. *Appl Environ Microbiol.*, 55(8): 1949-1954.

Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninky, J. J., and White, T. J. (1990): PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, 3-12.

Ishii, Y., Konishi, J., Okada, H., Hirasawa, K., Onaka, T., and Suzuki, M. (2000): Operon structure and functional analysis of the genes encoding hermophilic desulfurizing enzymes of *Paenibacillus* sp. A11-2. *Biochem Biophys Res Commun.*, 270(1): 81-88.

Itoi, Y., Inoue, M., and Enomoto, S. (1986): Epoxidation of fatty acid esters with aqueous hydrogen peroxid in the presence of molybdenum oxide-tributyltin chloride on charoal catalyst. *Bull Chem Soc Jpn.*, 59: 3941-3943.

Kanamori, T., Kanou, N., Atomi, H., and Imanaka, T. (2004): Enzymatic characterization of a prokaryotic urea carboxylase. *J Bacteriol.*, 186(9): 2532-2539.

King, M. T., Reiss, R. D., and Cornell, N. W. (1988): Determination of short-chain coenzyme A compounds by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.*, 166: 70-79.

Kimura, Y., Miyake, R., Tokumasu, Y., and Sato, M. (2000): Molecular cloning and characterization of two genes for the biotin carboxylase and carboxyltransferase subunits of acetyl coenzyme A carboxylase in *Myxococcus Xanthus*. *J Bacteriol.*, 182(19): 5462-5469.

Knowles, J. R. (1989): The mechanism of biotin-dependent enzymes. Annu Rev Biochem., 58: 195-221.

Kondo, H., Shiratsuchi, K., Yoshimotoa, T., Masuda, T., Kitazono, A., Tsuruo, D., Anai, M., Sekiguchi, M., and Tanabe, T. (1991): Acetyl-CoA carboxylase from *Escherichia coli*: gene organization and nucleotide sequence of the biotin carboxylase subunit. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(21): 9730-9733.

Koolman, J., und Röhm, K.-H. (1994): Taschenatlas der Biochemie. Stuttgart; New York: George Thieme Verlag, ISBN 3-13-759401-4.

Kuhlmann, A. U., and Bremer, E. (2002): Osmotically regulated synthesis of the compatible solute ectoine in *Bacillus pasteurii* and related *Bacillus* spp. *Appl Environ Microbiol.*, 68(2): 772-783.

Kuklev, D. V., and Smith, W. L. (2006): Chemical C2-elongation of polyunsaturated fatty acids. *Chemistry and physics of lipids.*, 144(2): 172-177.

Kull, U. (1993): Grundriss der allgemeinen Botanik. Stuttgart, Jena, New York: Gustav-Fischer-Verlag.

Kumar, S., Kaur, P., and Chimni S. S. (2002): The efficient allylation of 2-oxocarboxylic acids. Synthesis of 2-allyl derivatives of 2-hydroxycarboxylic acids. *Synlett*, 4: 573-574, Georg Thieme Verlag Stuttgart New York, ISSN 0936-5214.

Kumar Bhat, R., and Berger, S. (2007): New and easy strategy for cloning, expression, purification, and characterization of the 5S subunit of transcarboxylase from *Propionibacterium f. shermanii*. *Prep Biochem Biotechnol.*, 37(1): 13-26.

Kunau, W. H., Dommes, V., and Schulz, H. (1995): β -oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res.*, 34(4): 267-342.

Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259): 680-685.

Lange, B. M., Rujan, T., Martin, W., and Croteau, R. (2000): Isoprenoid biosynthesis: the evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(24): 13172-13177.

Larson, T. R., and Graham, I. A. (2001): Technical advance: a novel technique for the sensitive quantification of acyl CoA esters from plant tissues. *Plant J.*, 25(1): 115-125.

Lau, E. P., Cochran, B. C., and Fall, R. R. (1980): Isolation of 3-methylcrotonyl-coenzym A carboxylase from bovine kidney. *Arch Biochem Biophys.*, 205(2): 352-359.

Laue, T., und Plagens, A. (2004):Namen- und Schlagwort-Reaktionen der Organischen Chemie. 4. Auflage, Teubner Verlag Wiesbaden, ISBN 3-519-33526-3.

Le Mignot, V., Lièvre, C., Fréchou, C., and Demailly, G. (1998): ChemInform abstract: Wittig reaction of non-protected aldoses: synthesis of α , β -unsaturated esters. *Tetrahydron Lett.*, 39: 983-984.

Li, S. J., and Cronan, J. E. (1992a): The gene encoding the biotin carboxylase subunit of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem.*, 267(2): 855-863.

Li, S. J., and Cronan, J. E. (1992b): The genes encoding the two carboxyl transferase subunits of *Escherichia coli* acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem.*, 267(24): 16841-16847.

López-Casillas, F., Bai, D. H., Luo, X. C., Kong, I. S., Hermodson, M. A., and Kim, K. H. (1988): Structure of the coding sequence and primary amino acid sequence of acetyl-coenzyme A carboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85(16): 5784-5788.

Lynen, F., and Ochoa, S. (1953): Enzymes of fatty acid metabolism. *Biochim Biophys Acta.*, 12(1-2): 299-314.

Ma, Z., Rao, Z., Xu, L., Liao, X., Fang, H., Zhuge, B., and Zhuge, J. (2009): Expression of *dha* operon required for 1,3-PD formation in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Microbiol.*, 60(3): 191-198.

Machleidt, H., Hartmann, V., and Bünger, H. (1963): Organische Fluorverbindungen, II. Carbonyl-Olefinierungen von Fluorketonen. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 667(1): 35-47.

Marini, P., Li, S. J., Gardiol, D., Cronan, J. E. Jr., and De Mendoza, D. (1995): The genes encoding the biotin carboxyl carrier protein and biotin carboxylase subunits of *Bacillus subtilis* acetyl coenzyme A carboxylase, the first enzyme of fatty acid synthesis. *J Bacteriol.*, 177(23): 7003-7006.

Mc Gowan, S. J., Sebaihia, M., Porter, L. E., Stewart, G. S., Williams, P., Bycroft, B. W., and Salmond, G. P. (1996): Analysis of bacterial carbapenem antibiotic production genes reveals a novel beta-lactam biosynthesis pathway. *Mol Microbiol.*, 22(3): 415-426.

Mehta, A., Jaouhari, R., Benson, T. J., and Douglas, K. T. (1992): Improved efficiency and selectivity in peptide synthesis: use of triethylsilane as a carbocation scavenger in deprotection of *t*-butyl esters and *t*-butoxycarbonyl-protected sites. *Tetrahedron Letters*, 33(37): 5441-5444.

Meyers, A. I., Temple, D. L., Nolen R. L., and Mihelich, E. D. (1974): Oxazolines. IX. Synthesis of homologated acetic acids and esters. *J Org Chem.*, 39(18): 2778-2783.

Minami-Ishii, N., Taketani, S., Osumi, T., and Hashimoto, T. (1989): Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA for rat mitochondrial enoyl-CoA hydratase. Structural and evolutionary relationships linked to the bifunctional enzyme of the peroxisomal β -oxidation. *System Eur J Biochem.*, 185(1): 73-78.

Miquel, M., and Browse, J. (1992): *Arabidopsis* mutants deficient in polyunsaturated fatty acid synthesis. Biochemical and genetic characterization of a plant oleoylphosphatidylcholine desaturase. *J Biol Chem.*, 267(3): 1502-1509.

Mitchell, G. A., Wang, S. P., Ashmarina, L., Robert, M. F., Bouchard, G., Laurin, N., Kassovska-Bratinova, S., and Boukaftane, Y. (1998): Inborn errors of ketogenesis. *Biochem Soc Trans.*, 26(2), 136-140.

Mottet, C., Hamelin, O., Garavel, G., Deprés, J.-P., and Greene, A. E. (1999): A simple and efficient preparation of propargylic β -keto esters through transesterification. *J Org Chem.*, 64: 1380-1382.

Mukhopadhyay, B., Stoddard, S. F., and Wolfe, R. S. (1998): Purification, regulation, and molecular and biochemical characterization of pyruvate carboxylase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain Δ H. *J Biol Chem.*, 273(9): 5155-5166.

Muroi, J., Yorifuji, T., Uematsu, A., Shigematsu, Y., Onigata, K., Maruyama, H., Nobutoki, T., Kitamura, A., and Nakahata, T. (2000): Molecular and clinical analysis of Japanese patients with 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA lyase (HL) deficiency. *Hum Genet.*, 107(4): 320-326.

Nagano, T., Motoyoshiya, J., Kakehi, A., and Nishii, Y. (2008): SmI2-promoted Reformatsky-type reaction and acylation of alkyl 1-chlorocyclopropanecarboxylates. *Organic Letters*, 10(23): 5453-5456.

Nakamura, E. (2002): Organozinc chemistry. In: Schlosser, M. ed.: Organometallics in synthesis-a manual. 579-664, 2rd Ed, John Wiley & Sons Ltd, ISBN: 0 471 98416 7.

Nakamura, T., Yoshioka, I., Takahashi, M., Toh, H., and Izui, K. (1995): Cloning and sequence analysis of the gene for phosphoenolpyruvate carboxylase from an extreme thermophile, *Thermus sp. J Biochem.*, 118(2): 319-324.

Narasimhan, C., and Miziorko, H. M. (1992): *Pseudomonas mevalonii* 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase: characterization of the isolated recombinant protein and investigation of the enzyme's cation requirements. *Biochemistry*, 31(45): 11224-11230.

Newman, M. S., and Evans Jr., F. J. (1955): The Reformatsky reaction: effect of alkyl group in alkyl α-bromopropionates. *J Am Chem Soc.*, 77(4): 946-947.

Nieuwland, J. A., and Daly, S. F. (1931): A new modification of the Reformatsky reaction. *J Am Chem Soc.*, 53(5): 1842-1846.

Novy, R., Drott, D., Yaeger, K., and Mierendorf, R. (2001): Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *inNovations*, 12: 1-3.

Nuhn, P. (2006): In Naturstoffchemie – Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe, 4., neu bearb. Auflage, Hirzel S. Verlag, Stuttgart, ISBN 3-777-61363-0.

O'Brien, W. J., and Frerman, F. E. (1977): Evidence for a complex of three beta-oxidation enzymes in *Escherichia coli*: induction and localization. *J Bacteriol.*, 132(2): 532-540.

Organ, M. G., Froese, R. D. J., Goddard, J. D., Taylor, N. J., and Lange, G. L. (1994): Photoadditions and dialkylcuprate additions to 2-tert-butyl-2,6-dimetyl-1,3-dioxin-4-one and related heterocycles. Experimental, ab initio theoretical, and X-ray structural studies of facial selectivity and enone pyramidalization. *J Am Chem Soc.*, 116(8): 3312-3323.

Osumi, T., and Hashimoto, T. (1980): Purification and properties of mitochondrial and peroxisomal 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase from rat liver. *Arch Biochem Biophys.*, 203(1): 372-383.

Otera, J. (2003): Esterification. 1. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim, ISBN 3-527-30490-8.

Paduch, R., Kandefer-Szerszen, M., Trytek, M., and Fiedurek, J. (2007): Terpenes: substances useful in human healthcare. *Arch Immunol Ther Exp* (Warsz), 55(5): 315-327.

Palosaari, P. M., and Hiltunen, J. K. (1990): Peroxisomal bifunctional protein from rat liver is a trifunctional enzyme possessing 2-enoyl CoA hydratase, 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, and Δ^3 , Δ^2 -enoyl-CoA isomerase activities. *J Biol Chem.*, 265(5): 2446-2449.

Pfennig, N. (1974): *Rhodopseudomonas globiformis* sp. n., a new species of the Rhodospirillaceae. *Arch Mikrobiol.*, 100: 197-206.

Phillips, M. A., León, P., Boronat, A., and Rodríguez-Concepción, M. (2008): The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. *Trends Plant Sci.*, 13(12): 619-623.

Polakis, S. E., Guchhait, R. B., Zwergel, E. E., Lane, M. D., and Cooper, T. G. (1974): acetylcoenzym A carboxylase system of *Escherichia coli*: studies on the mechanisms of the biotin carboxylase and carboxyltransferase catalyzed reactions. *J Biol Chem.*, 249(20): 6657-6667.

Prakash, O., Kumari, K., and Lal, R. (2007): *Pseudomonas delhiensis* sp. nov., from a fly ash dumping site of a thermal power plant. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 57(Pt 3): 527-531.

Reche, P., Li, Y.-L., Fuller, C., Eichhorn, K., and Perham, R. N. (1998): Selectivity of post-translational modification in biotinylated proteins: the carboxy carrier protein of the acetyl-CoA carboxylase of *Escherichia coli*. *Biochem J.*, 329(Pt 3): 589-596.

Reetz, M. T. (2010): Laboratory evolution of stereoselective enzymes: a prolific source of catalysts for asymmetric reactions. *Angew Chemie Int Ed.*, 49: 2-39.

Riese, J., and Bachmann, R. (2004): Industrial biotechnology: turning the potential into pofits. Chemical Market Reporter. McKinsey&Company

Roberts, J. R., Narasimhan, C., and Miziorko, H. M. (1995): Evaluation of cysteine 266 of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase as a catalytic residue. *J Biol Chem.*, 270(29): 17311-17316.

Roberts, J. R., Mitchell, G. A., and Miziorko, H. M. (1996): Modeling of a mutation responsible for human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase deficiency implicates histidine 233 as an active site residue. *J Biol Chem.*, 271(40): 24604-24609.

Roberts, J. R., and Miziorko, H. M. (1997): Evidence supporting a role for histidine-235 in cation binding to human 3-hydroxy-3-methyglutaryl-CoA lyase. *Biochemistry*, 36(24): 7594-7600.

Robinson, A. M., and Williamson, D. H. (1980): Physiological roles of ketone bodies as substrates and signals in mammalian tissues. *Physiol Rev.*, 60(1): 143-187.

Rodríguez, E., and Gramajo, H. (1999): Genetic and biochemical characterization of the α and β components of a propionyl-CoA carboxylase complex of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Microbiology*, 145(Pt 11): 3109-3119.

Rodríguez, E., Banchio, C., Diacovich, L., Bibb, M. J., and Gramajo, H. (2001): Role of an essential acyl coenzyme A carboxylase in the primary and secondary metabolism of *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Appl Environ Microbiol.*, 67(9): 4166-4176.

Rohdich, F., Hecht, S., Bacher, A., and Eisenreich, W. (2003): Deoxyxylulose phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. Discovery and function of *ispDEFGH* genes and their cognate enzymes. *Pure Appl Chem.*, 75: 393-405.

Rohmer, M., Knani, M., Simonin, P., Sutter, B., and Sahm, H. (1993): Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem J.*, 295: 517-524.

Rosendal, J., and Knudsen, J. (1992): A fast and versatile method for extraction and quantitation of long-chain acyl-CoA esters from tissue: content of individual long-chain acyl-CoA esters in various tissues from fed rat. *Anal Biochem.*, 207(1): 63-67.

Roth, K. (2005): Eine unendliche chemische Geschichte. Chem Unserer Zeit, 39: 22-217; Wiley-VCH, Weinheim

Ruzicka, L. (1963): Perspektiven der Biogenese und der Chemie der Terpene. Pure Appl Chem., 6: 493-523.

Saito, S., Shiozawa, M., Nagahara, T., Nakadai, M., and Yamamoto, H. (2000): Molecular recognition of carbonyl compounds using Aluminium Tris(2,6-diphenylphenoxide) (ATPH): new regio- and stereoselective alkylation of α , β -unsaturated carbonyl compounds. *J Am Chem Soc.*, 122: 7847-7848.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989): Molecular clonig: a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Samols, D., Thornton, C. G., Murtif, V. L., Kumar, G. K., Haase, F. C., and Wood, H. G. (1988): Evolutionary conservation among biotin enzymes. *J Biol Chem.*, 263(14): 6461-6464.

Sato, S., Kanazawa, H., and Tsuge, T. (2011): Expression and characterization of (*R*)-specific enoyl coenzyme A hydratases making a channeling route to polyhydroxyalkanoate biosynthesis in *Pseudomonas putida*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 90(3): 951-959.

Schaeffer, T. L., Cantwell, S. G., Brown, J. L., Watt, D. S., and Fall, R. R. (1979): Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl Environ Microbiol.*, 38(4): 742-746.

Scharnewski, M. (2009): Untersuchungen zum Fettsäuretransport durch zelluläre und peroxisomale Membranen. Dissertation, Abteilung Biochemie der Pflanze, Georg-August-Universität Göttingen

Schiele, U., Niedermeier, R., Stürzer, M., and Lynen, F. (1975): Investigations of the structure of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase from *Achromobacter*. *Eur J Biochem.*, 60(1): 259-266.

Schiele, U., and Lynen, F. (1981): 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase from *Achromobacter*. *Methods Enzymol.*, 71: 781-791.

Schlegel, H. G., Kaltwasser, H., and Gottschalk, G. (1961): Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxidierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. *Arch Mikrobiol.*, 38: 209-222.

Schmidt, S. (2008): Untersuchungen zur Totalsynthese von Aculeatin. Diplomarbeit, Institut für Organische Chemie, Universität Stuttgart

Schneider, S., Sandalova, T., Schneider, G., Sprenger, G. A., and Samland, A. K. (2008): Replacement of a phenylalanine by a tyrosine in the active site confers fructose-6-phosphate aldolase activity to the transaldolase of *Escherichia coli* and human origin. *J Biol Chem.*, 283(44): 30064-30072.

Schneider, S., Gutierrez, M., Sandalova, T., Schneider, G., Clapes, P., Sprenger, G. A., and Samland, A. K. (2010): Redesigning the active site of transaldolase TalB from *Escherichia coli*: new variants with improved affinity towards nonphosphorylated substrates. *Chembiochem*, 11(5): 681-690.

Schulz, H. (1974): Long chain enoyl coenzyme A hydratase from pig heart. J Biol Chem., 249(9): 2704-2709.

Segura, D., and Espín, G. (2004): Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly- β -hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 65(4): 414-418.

Seubert, W. (1960): Degradation of isoprenoid compounds by micro-organisms. I. Isolation and characterization of an isoprenoid-degrading bacterium, *Pseudomonas citronellolis* n. sp. *J Bacteriol.*, 79: 426-434.

Seubert, W., and Remberger, U. (1963): Studies on the bacterial degradation of isoprenoid compounds. II. The role of carbon dioxide. *Biochemische Zeitschrift*, 338: 245-264.

Seubert, W., Fass, E., and Remberger, U. (1963): Studies on the bacterial degradation of isoprenoid compounds. III. Purification and properties of geranyl carboxylase. *Biochemische Zeitschrift*, 338: 265-275.

Seubert, W., and Fass, E. (1964a): Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. IV. The purification and properties of β -isohexenylglutaconyl-CoA hydratase and β -hydroxy- β -isohexenylglutaryl-CoA lyase. *Biochemische Zeitschrift*, 341: 23-34.

Seubert, W., and Fass, E. (1964b): Studies on the bacterial degradation of isoprenoids. V. The mechanism of isoprenoid degradation. *Biochemische Zeitschrift*, 341: 35-44.

Seubert, W., Lamberts, I., Kramer, R., and Ohly, B. (1968): On the mechanism of malonyl-CoAindependent fatty acid synthesis. I. The mechanism of elongation of long-chain fatty acids by acetyl-CoA. *Biochim Biophys Acta.*, 164(3): 498-517.

Seubert, W., and Lynen, F. (1953): Enzymes of the fatty acid cycle. II. Ethylene reductase. *J Amer Chem Soc.*, 75: 2787-2788.

Simeonova, D. D., Wilson, M. M., Metcalf, W. W., and Schink, B. (2010): Identification and heterologous expression of genes involved in anaerobic dissimilatory phosphite oxidation by *Desulfotignum phosphitoxidans*. *J Bacteriol.*, 192(19): 5237-5244.

Song, J., Wurtele, E. S., and Nikolau, B. J. (1994): Molecular cloning and characterization of the cDNA coding for the biotin-containing subunit of 3-methylcrotonoyl-CoA carboxylase: identification of the biotin carboxylase and biotin-carrier domains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(13): 5779-5783.

Soriano, A., Radice, A. D., Herbitter, A. H., Langsdorf, E. F., Stafford, J. M., Chan, S., Wang, S., Liu, Y. H., and Black, T. A. (2006): *Escherichia coli* acetyl-coenzyme A carboxylase: characterization and development of a high-throughput assay. *Anal Biochem.*, 349(2): 268-276.

Spurgeon, S. R., and Porter, J. W. (1981): In Biosynthesis of isoprenoid compounds; Porter, J. W., Spurgeon, S. L., Eds.; John Wiley and Sons: New York, 1: 1-46.

Stegink, L. D., and Coon, M. J. (1968): Stereospecificity and other properties of highly purified betahydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A cleavage enzyme from bovine liver. *J Biol Chem.*, 243(20): 5272-5279.

Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warrener, P., Hickey, M. J., Brinkmann, F. S. L., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrock-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K.-S., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E. W., Lory, S., and Olson, M. V. (2000): Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, 406: 959-964.

Steinman, H. M., and Hill, R. L. (1975): Bovine liver crotonase (enoyl coenzyme A hydratase). EC 4.2.1.17 *L*-3-hydroxyacyl-CoA hydrolyase. *Methods Enzymol.*, 35: 136-151.

Stern, J. R., and del Campillo, A. (1953): Enzymatic reaction of crotonyl coenzyme A. *J Am Chem Soc.*, 75: 2277-2278.

Stern, J. R. (1961): Crotonase. In: Boyer, P. D., Lardy, H., Myrback, K. (eds): The enzymes. ed2, vol.5, Academic Press: New York, p 511.

Stryer, L. (1996): Biochemie. Spectrum Akad. Verl., Heidelberg; Berlin; Oxford

Stumpp, T., Wilms, B., and Altenbuchner, J. (2000): Ein neues *L*-Rhamnose induzierbares Expressionssystem für *Escherichia coli*. *Biospektrum* 6: 33-36.

Sutton, M. R., Fall, R. R., Nervi, A. M., Alberts, A. W., Vagelos, P. R., and Bradshaw, R. A. (1977): Amino acid sequence of *Escherichia coli* biotin carboxyl carrier protein (9100). *J Biol Chem.*, 252(11): 3934-3940.

Tang, L., Shah, S., Chung, L., Carney, J., Katz, L., Khosla, C., and Julien, B. (2000): Cloning and heterologous expression of the epothilone gene cluster. *Science*, 287(5453): 640-642.

Tao, L., Sutcliffe, I. C., Russell, R. R. B., and Ferretti, J. J. (1993): Cloning and expression of the multiple sugar metabolism (*msm*) operon of *Streptococcus mutans* in heterologous streptococcal hosts. *Infect Immun.*, 61(3): 1121-1125.

Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.*, 22(22): 4673-4680.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. (1997): The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 25(24): 4876-4882.

Thurman, E. M., and Mills, M. S. (1998): Solid-phase extraction – principles and practice. In: Winefordner, J. D. (Hrsg.): Chemical analysis, Volume 147, A series of monographs on analytical chemistry and its applications. John Wiley & Sons, Inc., New York/Chichester/Weinheim/Brisbane/Singapur/Toronto 1998, ISBN 0-471-61422-X.

Timm, A., and Steinbüchel, A. (1990): Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent *pseudomonads. Appl Environ Microbiol.*, 56(11): 3360-3367.

Tozoni, D., Zacaria, J., Vanderlinde, R., Longaray Delamare, A. P., and Echeverrigaray, S. (2010): Degradation of citronellol, citronellal and citronellyl acetate by *Pseudomonas mendocina* IBPse 105. *Electr J Biotechnol.*, 13(2): 1-7.

Trentham, D. R. (1968): Aspects of the chemistry of d-glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase. *Biochem J.*, 109(4): 603-612.

Trost, B. M., Dogdanowicz, M. J., Frazee, W. J., and Salzmann, T. N. (1978): Oxasecoalcylation via cyclobutanone intermediates. *J Am Chem Soc.*, 100(17): 5512-5525.

Tsuchida, S., Kawamoto, K., Nunome, K., Hamaue, N., Yoshimura, T., Aoki, T., and Kurosawa, T. (2011): Analysis of enoyl-coenzyme A hydratase activity and its stereospecificity using highperformance liquid chromatography equipped with chiral separation column. *J Oleo Sci.*, 60(5): 221-228.

Tsuge, T., Fukui, T., Matsusaki, H., Taguchi, S., Kobayashi, G., Ishizaki, A., and Doi, Y. (2000): Molecular cloning of two (*R*)-specific enoyl-CoA hydratase genes from *Pseudomonas aeruginosa* and their use for polyhydroxyalkanoate synthesis. *FEMS Microbiol Lett.*, 184(2): 193-198.

Tsuge, T., Taguchi, K., Seiichi, T., and Doi, Y. (2003): Molecular characterization and properties of (*R*)-specific enoyl-CoA hydratases from *Pseudomonas aeruginosa*: metabolic tools for synthesis of polyhydroxyalkanoates via fatty acid β -oxidation. *Int J Biol Macromol.*, 31(4-5): 195-205.

Tuinstra, R. L., Burgner, J. W., and Miziorko, H. M. (2002): Investigation of the oligomeric status of the peroxisomal isoform of human 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase. *Arch Biochem Biophys.*, 408(2): 286-294.

Tuinstra, R. L., and Miziorko, H. M. (2003): Investigation of conserved acidic residues in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase: implications for human disease and for functional roles in a family of related proteins. *J Biol Chem.*, 278(39): 37092-37098.

Tuinstra, R. L., Wang, C. Z., Mitchell, G. A., and Miziorko, H. M. (2004): Evaluation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase arginine-41 as a catalytic residue: use of acetyldithio-coenzyme A to monitor product enolization. *Biochemistry*, 43(18): 5287-5295.

Uchida, Y., Izai, K., Orii, T., and Hashimoto, T. (1992): Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase/ 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein. *J Biol Chem.*, 267(2): 1034-1041.

Vani, P. V. S. N., Chida, A. S., Srinivasan, R., Chandrasekharam, M., and Singh, A. K. (2001): Synthesis of beta-Ionone. *Synth Commun.*, 31: 219-224.

Velasco, A., Acebo, P., Gomez, A., Schleissner, C., Rodríguez, P., Aparicio, T., Conde, S., Muñoz, R., de la Calle, F., Garcia, J. L., and Sánchez-Puelles, J. M. (2005): Molecular characterization of the safracin biosynthetic pathway from *Pseudomonas fluorescens* A2-2: designing new cytotoxic compounds. *Mol Microbiol.*, 56(1): 144-154.

Wada, M., Honna, M., Kuramoto, Y., and Miyoshi, N. (1997): A Grignard-typ addition of allyl unit to carbonyl compounds containing a carboxyl group by using BiCl₃-Zn(0)-allyl bromide. *Bull Chem Soc Jpn.*, 70(9): 2265-2267.

Wada, M., Ohki, H., and Akiba, K.-Y. (1986): Carbon-carbon bond formation with bismuth salt. A chemoselective Grignard-type addition of allyl unit to aldehydes. *Tetrahedron Letters*, 27(39): 4771-4774.

Wagner, M. (2008): Identifizierung und funktionale Charakterisierung neuartiger Acyltransferasen aus Mikroalgen. Dissertation, Albrecht-von-Haller-Institut für Pflanzenwissenschaften, Abteilung Biochemie der Pflanze, Georg-August-Universität Göttingen

Wallach, O. (1887): Zur Kenntniss der Terpene und der ätherischen Oele. Ann. 239: 1.

Wanders, R. J., Schutgens, R. B., and Zoeters, P. H. (1988): 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase in human skin fibroblasts: study of its properties and deficient activity in 3-hydroxy-3-methylglutaric aciduria patients using a simple spectrophotometric method. *Clin Chim Acta.*, 171(1): 95-101.

Wanders, R. J., Zoeters, P. H., Schutgens, R. B., de Klerk, J. B., Duran, M., Wadman, S. K., van Sprang, F. J., Hemmes, A. M., and Voorbrood, B. S. (1990): Rapid diagnosis of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency via enzyme activity measurements in leukocytes or platelets using a simple spectrophotometric method. *Clin Chim Acta.*, 189(3): 327-334.

Wang, J., Yu, Y., Tang, K., Liu, W., He, X., Huang, X., and Deng, Z. (2010): Identification and analysis of the biosynthetic gene cluster encoding the thiopeptide antibiotic cyclothiazomycin in *Streptomyces hygroscopicus* 10-22. *Appl Environ Microbiol.*, 76(7): 2335-2344.

Wang, X., Wurtele, E. S., and Nikolau, B. J. (1995): Regulation of β -methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase activity by biotinylation of the apoenzyme. *Plant Physiol.*, 108(3): 1133-1139.

Willadsen, P., and Eggerer, H. (1975): Substrate stereochemistry of the enoyl-CoA hydratase reaction. *Eur J Biochem.*, 54(1): 247-252.

Windgassen, M., Urban, A., and Jaeger, K.-E. (2000): Rapid gene inactivation in *Pseudomonas* aeruginosa. FEMS Microbiol Lett., 193(2): 201-205.

Winsor, G. L., Lo, R., Sui, S. J., Ung, K. S., Huang, S., Cheng, D., Ching, W. K., Hancock, R. E., and Brinkman, F. S. (2005): *Pseudomonas aeruginosa* genome database and PseudoCAP: facilitating community-based, continually updated, genome annotation. *Nucleic Acids Res.*, 33 (Database issue): D338-43.

Wood, H. G., and Barden, R. E. (1977): Biotin enzymes. Annu Rev Biochem. 46: 385-413.

Wu, W., Feng, Y., He, X., Hofstein, H. S., Raleigh, D. P., and Tonge, P. J. (2000): Stereospecificity of the reaction catalyzed by enoyl-CoA hydratase. *J Am Chem Soc.*, 122: 3987-3994.

Yaggi, N. F., and Douglas, K. T. (1977): Reactions of diketen with arenethiols: preparation of arylthioisocrotonic acids and S-aryl thioacetoacetat esters. *J Chem Soc., Chem Commun.*, 609-610.

Yamagiwa, Y., Koreishi, Y., Kiyozumi, S., Kobayashi, M., Kamikawa, T., Tsukino, M., Goi, H., Yamamoto, M., and Munakata, M. (1996): Synthesis of imidazole-containing ligands and studies on metall complexes. *Bull Chem Soc Jpn.*, 69(11): 3317-3323.

Yang, D., Gao, Q., and Lee, O.-Y. (2002): Lewis acid promoted phenylseleno group transfer tandem radical cyclization reactions. *Organic Letters*, 4(7): 1239-1241.

Yang, J., Ji, C., Zhao, Y., Li, Y., Jiang, S., Zhang, Z., Ji, Y., and Liu, W. (2001): BF₃OEt₂: an efficient catalyst for transesterification of β -ketoesters. *Synthetic Communications.*, 40(7): 957-963.

Yang, Y. R., and Schachman, H. K. (1993): In vivo formation of active aspartate transcarbamoylase from complementing fragments of the catalytic polypeptide chains. *Protein Science*, 2(6): 1013-1023.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene.*, 33(1): 103-119.

Zverev, V. V., and Khmel, I. A. (1985): The nucleotide sequence of the replication origin of plasmids ColA and ColD. *Plasmid*, 14: 192-199.

Danksagung

Bei Herrn *Prof. Dr. D. Jendrossek* bedanke ich mich für die Überlassung des Themas, sein Interesse am Fortgang der Arbeit, sowie seinen Ideen und seiner Unterstützung.

Bei Herrn *Prof. Dr. B. Plietker* möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, als Biologe in seiner Arbeitsgruppe chemisch arbeiten zu dürfen. Danke für das Interesse an dieser Arbeit, sowie die zahlreichen Denkanstöße aber auch aufbauenden Gespräche. Danke für den Glauben an diese Arbeit.

Bei Herrn *Prof. Dr. G. Sprenger* bedanke ich mich für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten zu dieser Dissertation an seinem Institut anfertigen zu dürfen.

An dieser Stelle möchte ich auch allen Analytik-Abteilungen der Universität Stuttgart danken, sowie *Dr. W. Armbruster* (Universität Hohenheim) für die HPLC-(ESI)-MS Messungen.

Herrn *Dr. Papageorgiou* (Universität von Turku, Finnland) und Herrn *Prof. Dr. Einsle* (Universität Freiburg) sowie ihren Mitarbeitern danke ich für die Versuche zur Kristallisation der Proteine AtuE und AtuA.

Des Weiteren gilt mein Dank allen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie für die nette Arbeitsatmosphäre und die stetige Hilfsbereitschaft. Insbesondere ein besonderes Dankeschön an *Karin Förster-Fromme* und *Sarah Schneider*.

Selbiges gilt natürlich auch für die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. B. Plietker*, welche mich so freundlich in Ihren Kreis aufnahmen und mir für Fragen und Tipps immer zur Verfügung standen. Danke an *Andreas Jelonek*, *Matthias Neisius*, *Tobias Schabel* und *Michael Holzwarth*, welche in den zwei Jahren ihre Abzüge mit mir teilten, wobei ein ganz besonderes Dankeschön an *Michael Holzwarth* geht. Ohne seine Betreuung wäre ich wahrscheinlich aufgeschmissen gewesen. Danke an ihn und *Nicole Biber* für die Hilfe beim chemischen formulieren und das Korrekturlesen des Chemie-Teils.

Weiterhin gilt mein Dank auch den Freunden, die ich hier nicht erwähnt habe.

Am meisten danke ich meiner Familie und *Dieter*, für ihre Liebe, ihre Unterstützung und ihren Glauben an mich und dafür, dass sie meine Launen während dieser Arbeit so gut wie möglich ertragen haben. Es tut mir leid, wenn ich euch mit meinen Selbstzweifeln zeitweise den letzten Nerv stahl. Ich danke euch!

Lebenslauf

Nadine Randel geboren am 10. Juni 1980 in Magdeburg

1991-1999	Sportgymnasium Magdeburg
07/1999	Allgemeine Hochschulreife
1999-2005	Biologiestudium (Diplom) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
03/2004-01/2005	Diplomarbeit bei Prof. Dr. J. R. Andreesen, Institut für Mikrobiologie, Universität Halle-Wittenberg
	Thema: "Untersuchungen zu Interaktionen der Proteine Mop, MoeA und Mog aus <i>Eubacterium acidaminophilum</i> , die an der Insertion von Wolframat in den Molybdopterin"-Cofaktor beteiligt sein sollen"
01/2005	Diplom Biologe
07/2002-10/2002	Betriebspraktikum: DaimlerChrysler AG Sindelfingen Thema: "Mikrobiologische Untersuchungen zur Qualität von aufbereitetem Wasser"
02/2005-06/2006	wissenschaftlicher Mitarbeiter, Martin-Luther-Universität Halle- Wittenberg, Institut für Mikrobiologie Arbeitsgruppe Prof. Dr. J. R. Andreesen
seit 10/2006	Beginn der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Arbeit bei Prof. Dr. D. Jendrossek am Institut für Mikrobiologie der Universität Stuttgart
seit 07/2008	Beginn der experimentellen Arbeiten in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. B. Plietker am Institut für Organische Chemie der Universität Stuttgart

Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbständig verfasst und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmitteln angefertigt habe.

Sindelfingen, den 16. Januar 2012

Nadine Randel