

**Mechanistische Untersuchungen
an Terpensynthesen aus
*Medicago truncatula***

Dissertation

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

vorgelegt dem Rat der Chemisch-Geowissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplomchemiker

Stefan Garms

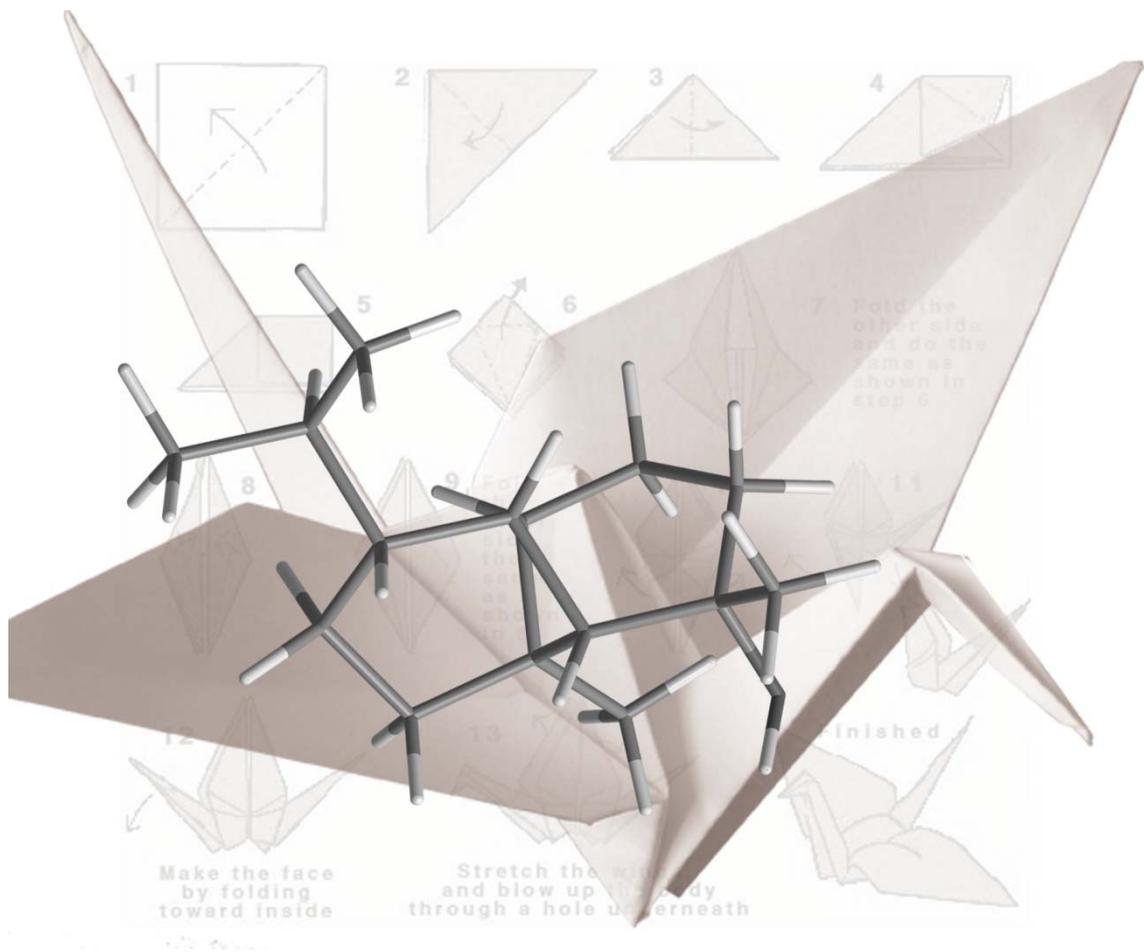
geboren am 07. April 1978 in Gera

Gutachter:

1. Prof. Dr. Wilhelm Boland, Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena
2. Prof. Dr. Georg Pohnert, Friedrich-Schiller-Universität, Jena
3. Prof. Dr. Dr. h. c. mult. Wittko Francke, Universität Hamburg

Tag der öffentlichen Verteidigung: 15.12.2010

Mechanistische Untersuchungen an Terpensynthasen aus *Medicago truncatula*



Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeines	1
1.2	Terpenbiosynthese in Pflanzen	2
1.2.1	Biosynthese von C ₅ -Grundbausteinen der Terpene	2
1.2.2	Biosynthese der azyklischen Vorläufer der Terpenfamilien	5
1.2.3	Kompartimentierung	6
1.3	Terpensynthesen	7
1.3.1	Enzymologie	7
1.3.2	Reaktionsmechanismus der Sesquiterpensynthesen	9
1.3.3	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	12
1.4	Induzierte Duftstoffe der Modellpflanze <i>Medicago truncatula</i>	15
2	Zielstellung	18
3	Ergebnisse	19
3.1	Klonierung und Expression von drei Terpensynthasegenen aus <i>Medicago truncatula</i>	19
3.2	Substratspezifität von MtTPS1, MtTPS3 und MtTPS5	20
3.3	Die Sesquiterpensynthase MtTPS5	23
3.3.1	Sesquiterpenprodukte von MtTPS5	23
3.3.2	Stereochemie und Konformationsanalyse der möglichen Bildungswege der Enzymprodukte der MtTPS5	26
3.3.3	Biochemische Charakterisierung	28
3.3.4	Synthese von Substratanaloga	32
3.3.5	Hydrid-Shifts und 1,3-Deprotonierungen während der Bildung der MtTPS5 Reaktionsprodukte	35
3.3.6	Protonentransferreaktionen bei der Bildung von Cadalanen und <i>allo</i> -Aromadendren (57)	39
3.3.7	Identifizierung von Tyrosin 526 als Schlüsselaminosäure für den Protonierungsmechanismus	42
3.3.8	Frühe Stufen in der Produktbildung der Cadalane	45
3.3.9	Modellierung von Enzym-Substratkomplexen	52

4 Diskussion.....	59
4.1 Die Rolle der Terpensynthasen MtTPS1, MtTPS3 und MtTPS5 bei der induzierten Duftstoffemission in <i>Medicago truncatula</i>	59
4.2 Die biochemischen Eigenschaften der MtTPS5.....	63
4.3 Mechanismus der Produktbildung ausgehend von (2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-Farnesyldiphosphat (22).....	65
4.4 Enzymatische Kontrolle der Reaktionskanäle	70
4.5 Die Rolle des Tyrosin 526 in der Katalyse von MtTPS5	71
4.6 Mechanismus der MtTPS5-katalysierten Zyklisierungen von (2 <i>Z</i> ,6 <i>E</i>)-FDP (76) – ein „schlafender biosynthetischer Weg“?.....	74
4.7 Frühe Stufen in der Cadalanbildung.....	78
5 Zusammenfassung	82
6 Experimenteller Teil	85
6.1 DNA- und Proteintechniken.....	85
6.1.1 Herstellung und Reinigung rekombinanter Terpensynthasen	85
6.1.2 Herstellung von hochreinem Protein für die Enzymcharakterisierung.....	86
6.1.3 Proteinquantifizierung nach Bradford.....	86
6.1.4 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)	86
6.1.5 Bestimmung des Molgewichts von Terpensynthasen	87
6.1.6 Site directed Mutagenesis (Tobias Köllner)	88
6.1.7 Aktivitätsbestimmung von rekombinanten Terpensynthasen.....	88
6.2 Techniken zu Terpenisolierung und -analyse	91
6.2.1 Terpenidentifizierung	91
6.2.2 Gewinnung von Referenzsubstanzen.....	92
6.2.3 Identifizierung von Terpengrundgerüsten.....	93
6.2.4 Terpenanalyse.....	94
6.3 Computergestützte Proteinstrukturanalysen.....	96
6.4 Synthesen.....	97
7 Literaturverzeichnis	110
8 Anhang	120

8.1	Abkürzungsverzeichnis	120
8.2	Daten zur Identifizierung der Enzymprodukte	122
8.2.1	Retentionsindizes	122
8.2.2	Stereochemische Analyse	125
8.2.3	Massenspektren.....	130
8.3	Daten von D ₂ O-Markierungsexperimenten.....	144
8.4	Synthesedaten	146
8.4.1	¹ H- und ¹³ C-NMR-Spektren	146
8.4.2	IR-Spektren	161
8.4.3	MS-Spektren.....	166
8.5	Veröffentlichungen.....	169
8.6	Danksagung.....	172
8.7	Lebenslauf.....	174

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Mit bisher über 30.000 Verbindungen bilden die Terpene eine der größten und strukturell vielfältigsten Klasse der Naturstoffe.¹ Die Terpene kommen nahezu ubiquitär in der Natur vor und konnten aus verschiedensten Lebewesen, wie Pflanzen, Bakterien, Pilzen und wirbellosen marinen Organismen isoliert werden.²⁻⁴ Fast die Hälfte aller bekannten terpenoiden Strukturen wird von Pflanzen synthetisiert und ist meist der Hauptbestandteil von ätherischen Ölen, die aus Blättern, Blüten, Früchten, Harzen und Wurzeln gewonnen werden. Den durch flüchtige Terpene hervorgerufenen ausgeprägten Geruch dieser natürlichen Öle verwendeten die Menschen bereits im alten Ägypten zur Herstellung von Duftstoffen und Kosmetika. Heute noch bilden solche Öle und Harze die Basis einer großen Bandbreite kommerziell genutzter Produkte, z. B. Geschmacks- und Geruchsstoffe wie Menthol, Citronellol und Geraniol.⁵ Neben ihrem Einsatz in der Duft- und Aromaindustrie werden Terpene heutzutage zur Gummierstellung (Kautschuk, Guttapercha), als synthetische Intermediate oder als Lösungsmittel für Lacke und Harze verwendet. Darüber hinaus haben einige Isoprenoide aufgrund ihrer pharmakologischen Wirksamkeit Bedeutung erlangt. Ein bekanntes Beispiel ist das aus den Rinden der pazifischen Eibe (*Taxus brevifolia*) gewonnene Diterpenderivat Palitaxel (Taxol[®]), das zur Behandlung verschiedener Krebsarten eingesetzt wird.⁶ Das gegen Malaria wirksame Sesquiterpen Artemisinin⁷⁻⁹ oder herzwirksame Glycoside mit einem Triterpengrundgerüst (z. B. Digitoxin)¹⁰ sind weitere pharmazeutisch genutzte Terpene.

Die biologische Bedeutung der Terpene ist so vielfältig wie ihre Strukturen (Abb. 1). Eine relativ geringe Anzahl der terpenoiden Verbindungen kann dem Primärmetabolismus zugeordnet werden. Diese für das Überleben essentiellen Stoffe übernehmen dabei verschiedene Aufgaben, z. B. in der Atmungskette als Elektronen- und Protonenfänger (Ubichinone (**1**)), in der Verbesserung der Lichtabsorption bei der Photosynthese (Carotinoide), im Sehprozess als Chromophore (all-*trans*-Retinal (**2**)) oder in der Steuerung der Membraneigenschaften von Zellen (Lanosterol (**4**)). Das Stresshormon Cortisol (**5**), sowie Gibberellinsäure (**3**) und Abscisinsäure, die unter anderem antagonistisch das Längenwachstum bei höheren Pflanzen steuern, sind Beispiele für Terpene mit hormonellen Wirkungen.

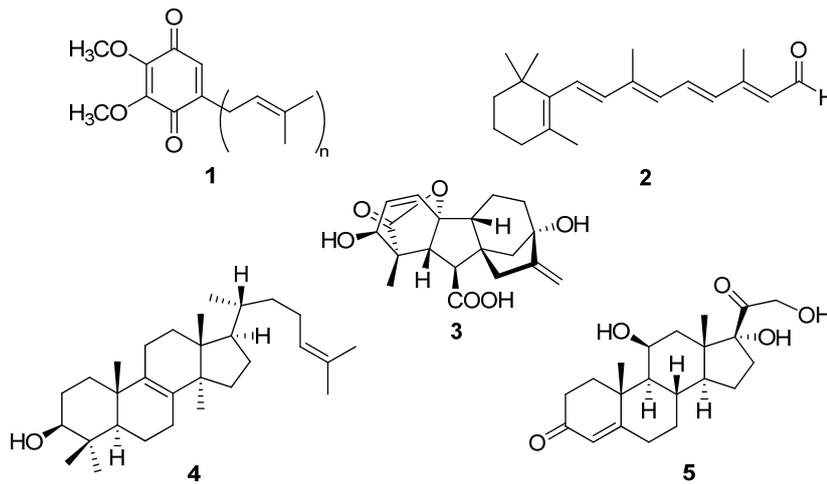


Abb. 1. Terpene mit biologischer Bedeutung. Ubichinone (1), all-*trans*-Retinal (2), Gibberellinsäure (3), Lanosterol (4), Cortisol (5).

Die Mehrheit der Terpene gehört zu den Sekundärmetaboliten, die von Pflanzen aktiv im Überlebenskampf eingesetzt werden. So spielen Mono- und Sesquiterpene und ihre Derivate eine entscheidende Rolle bei Abwehr- und Schutzmechanismen. Eine hohe Konzentration an Terpenen wird z. B. in den Blättern der Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) oder in den Harzgängen des Xylems von Koniferen beobachtet, wo sie als Fraßhemmstoffe, Toxine oder in Form von Harzen als mechanische Barriere fungieren.^{11,12} Abgesehen von dieser direkten Abwehr sind isoprenoide Verbindungen auch in die indirekte Abwehr von Herbivoren involviert. Beispielsweise emittieren Maispflanzen nach dem Befall mit Raupen ein komplexes Duftbouquet, das überwiegend aus Terpenen besteht. Damit locken sie parasitäre Schlupfwespen an, die ihre Eier in den Herbivoren ablegen und zu einer aktiven Reduktion des Schädlingsbefalls führen.^{13,14} Weiterhin dienen flüchtige Terpene als Lockstoffe für Bestäuber¹⁵⁻¹⁷ oder als Signalstoffe für die interplantzliche Kommunikation.¹⁸⁻²⁰

1.2 Terpenbiosynthese in Pflanzen

1.2.1 Biosynthese von C₅-Grundbausteinen der Terpene

Otto Wallach erkannte, dass Isopren der Grundbaustein der Terpene ist, wofür er 1910 mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet wurde.²¹ Aufbauend auf den Arbeiten von Wallach fand Leopold Ruzicka (Zürich) heraus, dass Isopren ein universeller Baustein für die Synthese vieler Naturstoffe wie der Steroide ist, was ebenfalls mit dem

Nobelpreis für Chemie honoriert wurde. Als Resultat seiner Untersuchungen formulierte er 1939 eine biogenetische Isoprenregel nach der alle Terpene aus einer hypothetischen Vorstufe, die er „aktives Isopren“ bezeichnete, hervorgehen.²² Wenig später konnte Feodor Lynen (München) Isopentenylidiphosphat (**11**, IDP) als das gesuchte „aktive Isopren“ identifizieren.²³ Die Biosynthese des IDP (**11**) wurde in den 50er Jahren vor allem von Feodor Lynen, Konrad Bloch, John Cornforth und George Popjak aufgeklärt. Lange Zeit galt dieser sogenannte Mevalonat-Weg (MVA-Weg) als einzige Quelle für den C₅-Grundkörper der Terpene. Anfang der 90er Jahre führten einige unerwartete und schwer zu erklärende Ergebnisse von Fütterungsexperimenten und Inhibitorstudien zur Entdeckung einer alternativen Route, dem Methylerythritol-Weg (MEP-Weg).²⁴⁻²⁷ Während in Menschen, Tieren, Pilzen, Hefen und Archebakterien nur der MVA-Weg vorhanden ist, bedienen sich Pflanzen, verschiedene Algen und Bakterien beider Wege.^{28,29}

Der im Zytosol lokalisierte Mevalonat-Weg (MVA-Weg, Abb. 2) nutzt zum Aufbau des Isopentenylidiphosphats (**11**, IDP) drei Moleküle Acetyl-Coenzym A (**6**, Acetyl-CoA).³⁰ Im ersten Schritt erfolgt unter Beteiligung der Acetoacetyl-CoA-Thiolase ((a), Abb. 2) die Bildung von Acetoacetyl-CoA (**7**) im Sinne einer Claisen-Kondensation. Das Anfügen eines weiteren Moleküls Acetyl-CoA (**6**) durch eine Aldolreaktion liefert 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (**8**), das in einer NADPH-abhängigen irreversiblen Reaktion zu 3-Hydroxy-3-methylglutarat (**9**, HMG) reduziert wird. Mevalonsäure, der Trivialname von HMG und gleichzeitiger Namensgeber dieses Biosyntheseweges, wird unter Verbrauch von zwei Molekülen ATP schrittweise in das entsprechende Diphosphat **10** umgewandelt. Die Freisetzung von IDP (**11**) erfolgt über die ATP-abhängige Decarboxylierung von **10**. Eine Verschiebung der C2-C3-Doppelbindung des IDP (**11**) durch die Isopentenylidiphosphat- $\Delta^{2,3}$ -Isomerase ((g), Abb. 2) resultiert in der Bildung von Dimethylallyldiphosphat (**12**, DMADP), dem zweiten essentiellen Grundbaustein der Terpenbiosynthese.

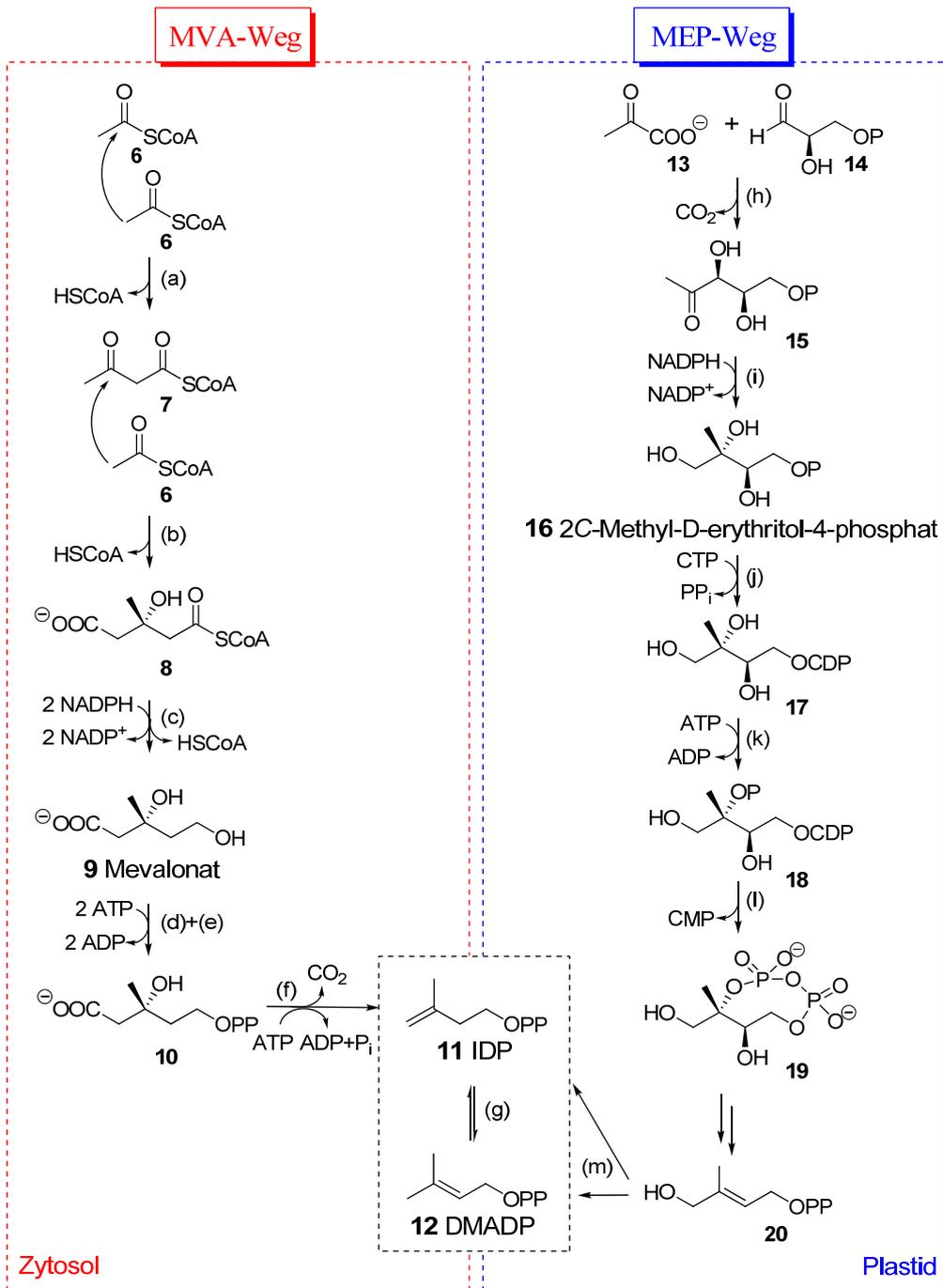


Abb. 2. Biosynthese der aktiven Isopren-Einheiten IDP (11) und DMADP (12). Beteiligte Enzyme am MVA-Weg: (a) Acetoacetyl-CoA-Thiolase, (b) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Synthase, (c) HMG-CoA-Reduktase, (d) Mevalonat-Kinase, (e) Phosphomevalonat-Kinase, (f) Phosphomevalonat-Decarboxylase, (g) Isopentenylidiphosphat- $\Delta^{2,3}$ -Isomerase. Beteiligte Enzyme am MEP-Weg: (h) 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat-Synthase, (i) 1-Desoxy-D-xylose-5-phosphat-Reduktoisomerase, (j) Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Synthase, (k) Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol-Kinase, (l) 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat-Synthase, (m) 1-Hydroxy-2-methylbutenyl-4-diphosphat-Reduktase.

Höhere Pflanzen haben die Fähigkeit, die beiden C₅-Grundkörper IDP (**11**) und DMADP (**12**) über einen weiteren Biosyntheseweg herzustellen. Der sogenannte MEP-Weg (Abb. 2) verdankt seinen Namen dem intermediär auftretenden 2C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (**16**, MEP). Unter dem katalytischen Einfluss der 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Synthase ((h), Abb. 2) wird im einleitenden Schritt die Verknüpfung von Pyruvat (**13**) mit Glyceraldehyd-3-phosphat (**14**) zu 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat (**15**) unter Freisetzung von CO₂ erreicht. Anschließende Reduktion mit gleichzeitiger Umlagerung des Kohlenstoffgerüsts durch die 1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat-Reduktoisomerase ((i), Abb. 2) unter Verbrauch von NADPH liefert MEP (**16**). Auf dem weiteren Weg zu IDP (**11**) und DMADP (**12**) wird die Hydroxygruppe am Kohlenstoffatom C4 durch die Verknüpfung mit einem Cytidyldiphosphatrest (CDP) aktiviert. Das entstandene Cytidyl-3-methyl-D-erythritol (**17**) wird an Position C2 phosphoryliert (**18**) und anschließend in den zyklischen Phosphorsäureester 2C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat (**19**) unter Abspaltung von Cytidinmonophosphat (CMP) überführt. Die Bildung von IDP (**11**) und DMADP (**12**) ausgehend von **19** erfolgt durch zwei reduktive Dehydratisierungsschritte über das Intermediat 1-Hydroxy-(2E)-butenyl-4-diphosphat (**20**).^{31,32}

1.2.2 Biosynthese der azyklischen Vorläufer der Terpenfamilien

Die Terpenbiosynthese lässt sich in drei Phasen einteilen. Die Bildung von IDP (**11**) und DMADP (**12**) über den MVA- oder MEP-Weg kennzeichnet die erste Stufe. In der zweiten Phase werden die beiden isomeren C₅-Diphosphate über Kopf-Schwanz-Verknüpfungen durch Prenyltransferasen zu größeren Baueinheiten zusammengefügt.^{33,34} Dabei erfolgt im ersten Schritt die Abspaltung des Diphosphatanions von DMADP (**12**) unter Freisetzung eines Allylkations (Kopf), das anschließend unter elektrophiler Addition mit der Doppelbindung (Schwanz) von IDP (**11**) reagiert. Die Eliminierung eines Protons liefert (2E)-Geranyldiphosphat (**21**, GDP), die direkte Vorstufe der Monoterpene (C₁₀) (Abb. 3). Kettenverlängerung durch Einbau von IDP (**11**) in analogen Reaktionssequenzen liefert (2E,6E)-Farnesyldiphosphat (**22**, FDP), den Vorläufer der Sesquiterpene (C₁₅) und (2E,6E,10E)-Geranylgeranyldiphosphat (**23**, GGDP), die Ausgangsverbindung der Diterpene (C₂₀). Weiteres Anfügen von IDP-Einheiten führt bis zu makromolekularen Terpenen unterschiedlicher Kettenlänge (z. B. Kautschuk).

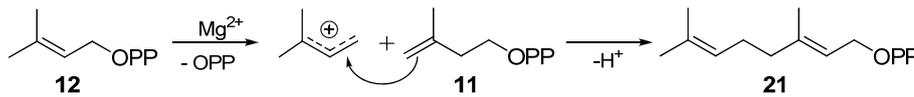
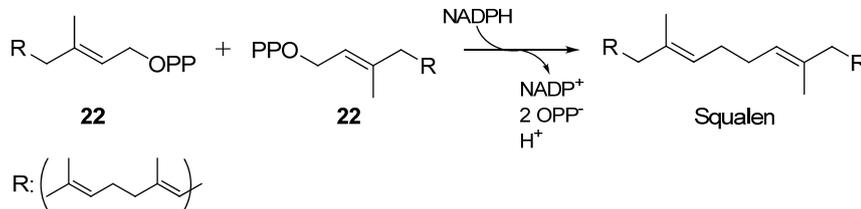
Kopf-Schwanz-Verknüpfung**Kopf-Kopf-Verknüpfung**

Abb. 3. Bildung von GDP (21) (oben) und Squalen (unten) durch Kopf-Schwanz- bzw. Kopf-Kopf-Verknüpfung.

In der dritten Phase gehen die drei azyklischen Vorstufen GDP (21), FDP (22) und GGDP (23) verschiedene Reaktionen ein. Die Kopf-Kopf-Dimerisierung von zwei Molekülen FDP (22) bzw. GGDP (23) liefert den Triterpengrundkörper Squalen (C_{30} , Abb. 3) und den Tetraterpengrundkörper Phytoen (C_{40}). Weiterhin dienen 22 und 23 als Ausgangsstoffe zur Synthese von Prenylseitenketten, die durch Alkylierungsreaktionen mit Proteinen, Chinonen oder anderen Biomolekülen verknüpft werden.³⁵ Eine weitere Reaktionsmöglichkeit von GDP (21), FDP (22) und GGDP (23) besteht in der metallvermittelten, intramolekularen Zyklisierung, durch die Verbindungen mit zum Teil komplexen Ringsystemen aufgebaut werden.

1.2.3 Kompartimentierung

Die Bildungswege für IDP (11) und DMADP (12) sind in Pflanzen in verschiedenen zellulären Kompartimenten lokalisiert.^{30,32,36} Während der MEP-Weg in den Plastiden die biosynthetischen Vorstufen für Isopren, die Mono- und Diterpene, die Carotinoide, Chlorophyll und die Tocopherole liefert, ist der MVA-Weg spezifisch für das Zytosol und ist dort am Aufbau der Sesqui- und Triterpene sowie der Phytosterole beteiligt (Abb. 4). Obwohl die subzelluläre Kompartimentierung den beiden Biosynthesewegen erlaubt, unabhängig voneinander zu agieren, konnte ein gewisser Austausch von Vorstufen (*metabolic crosstalk*) beobachtet werden, der vorzugsweise vom Plastiden in Richtung Zytosol verläuft.³⁷⁻⁴⁰ Der Umfang und die Richtung des Austausches hängen von der Spezies ab und können bei der Regulation des Terpenstoffwechsels eine

wichtige Rolle spielen.^{41,42} Neben der Separation der Biosynthesewege für IDP (**11**) und DMADP (**12**), sind auch die weiteren Umsetzungen zu den Prenyldiphosphaten und die Bildung der entsprechenden Terpenfamilien zwischen Plastiden (GDP und GGDP, Mono- und Diterpene) und Zytosol (FDP, Sesquiterpene) aufgeteilt (Abb. 4). Da die Enzyme im Zytosol produziert werden, enthalten Mono- und Diterpensynthasen am N-Terminus ein Signalpeptid, das den intrazellulären Transport in die Plastiden vermittelt, wo die Transitsequenz wieder abgespalten wird. Aber auch die Trennung der GDP- und FDP-Pools ist nicht in allen Fällen strikt.^{42,43}

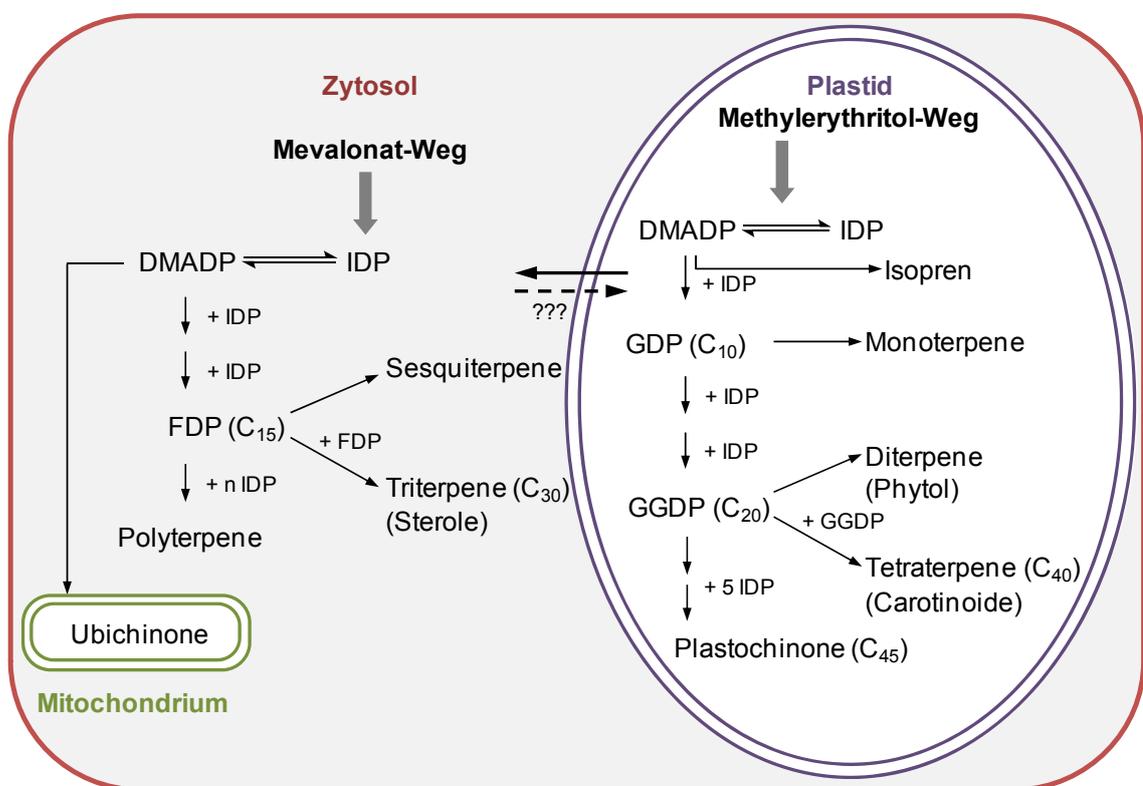


Abb. 4. Kompartimentierung der Terpenbiosynthese.

1.3 Terpensynthasen

1.3.1 Enzymologie

Zurzeit sind etwa 1000 Monoterpene, 7000 Sesquiterpene und 3000 Diterpene bekannt.¹ Der Aufbau der zum Teil komplexen Ringsysteme aus den entsprechenden Prenyldiphosphaten wird durch sogenannte Terpensynthasen (Terpenzyklen)

vermittelt. Eine Vielzahl von Terpensynthasen konnte in Form der cDNA kloniert oder direkt aus Pflanzen isoliert werden.^{44,45} Dabei zeigte sich, dass die näher untersuchten Proteine ähnliche biochemische Eigenschaften besitzen. So kodieren die cDNAs der Terpensynthasen für Enzyme mit einer Kettenlänge von 550-850 Aminosäuren, woraus Molekulargewichte von 50-100 kDa resultieren.⁴⁶ Aufgrund des Fehlens einer N-terminalen Signalsequenz, die im Falle der Mono- und Diterpensynthasen eine plastidäre Lokalisation bedingt, sind Sesquiterpensynthasen im Allgemeinen um 50 bis 70 Aminosäuren kürzer als die beiden anderen Vertreter der Enzymklasse. Das pH-Optimum der Enzymaktivität liegt meist in einem Bereich von pH = 6,0-7,5, kann aber auch ins Basische verschoben sein.⁴⁷ Als Kofaktoren benötigen Terpensynthasen divalente Metallkationen, wie Mg^{2+} - oder Mn^{2+} -Ionen. Im Gegensatz zu allen anderen Terpensynthasen sind Monoterpensynthasen aus Gymnospermen zusätzlich auf ein monovalentes Kation, meist K^+ , angewiesen und zeigen eine Bevorzugung von Mn^{2+} - bzw. Fe^{2+} -Ionen gegenüber Mg^{2+} -Ionen.⁴⁶ Abhängig vom Reaktionsmechanismus und der Tertiärstruktur können Terpensynthasen in zwei Klassen unterteilt werden. Typ-I Terpenzyklen zeichnen sich durch eine metallvermittelte Abspaltung der Diphosphatgruppe aus. Hierzu zählen Mono-, Sesqui- und Diterpensynthasen. Im Gegensatz dazu übertragen Typ-II Terpensynthasen im ersten Schritt ein Proton auf eine C-C-Doppelbindung oder eine in einer vorgelagerten Reaktion gebildete Epoxidgruppe.⁴⁸ Beispiele für Typ-II Terpensynthasen stellen die Lanosterolsynthese und die Squalen-Hopensynthese dar.^{49,50} Ein gemeinsames Merkmal beider Mechanismen ist, dass im ersten Schritt hochreaktive Carbokationen gebildet werden, die nachfolgend sehr ähnliche Reaktionsschritte, wie Zyklisierung, Umlagerungen, Methyl- und Hydrid-Shifts, durchlaufen. Neben der unterschiedlichen Initiierung der Reaktionskaskaden differieren Typ-I und Typ-II Terpensynthasen ebenfalls in ihrer Tertiärstruktur. Für den Typ-I ist eine α -helikale Struktur charakteristisch, während der Typ-II ein mit dem Typ-I nicht verwandtes α -barrel-Motiv besitzt.⁵¹ Interessanterweise bestehen pflanzliche ionisierungsabhängige Terpensynthasen aus zwei Domänen. Eine besitzt das Faltungsmotiv vom Typ-I und die andere das Motiv vom Typ-II. Die Umsetzung der Prenyldiphosphate findet in der Typ-I Domäne statt, wohingegen für die Typ-II Domäne noch keine Aktivität nachgewiesen werden konnte.⁵²

Eine weitere Möglichkeit Terpensynthasen (TPS) und im Speziellen, die pflanzlichen Ursprungs zu klassifizieren, bietet der Vergleich der Aminosäuresequenz. Die anfängliche Unterteilung in sechs Untergruppen *Tpsa-Tpsf* wurde im Laufe der Zeit

nach Identifizierung zusätzlicher Monoterpensynthasen, um die Gruppe Tpsg erweitert.^{46,53} Die am Sekundärmetabolismus beteiligten Mono- und Sesquiterpensynthasen bilden die Gruppen Tpsa, Tpsb und Tpsd. Da sich die wenigen bisher bekannten Terpensynthasen des Primärmetabolismus in ihrer Sequenz wesentlich von denen des Sekundärmetabolismus unterscheiden, werden sie in die Untergruppe Tps e und Tps c eingeordnet. Die Gruppe Tps f besteht zurzeit aus nur einem Vertreter, der Linaloolsynthase aus *Clarkia breweri*, welche die Sequenzmerkmale sowohl der Synthasen des Primär- als auch des Sekundärmetabolismus zeigt. Weiterhin zeigen Terpensynthasen einer Spezies untereinander eine größere Verwandtschaft, als zu mechanistisch verwandten Enzymen anderer Spezies. So katalysieren zum Beispiel Monoterpensynthasen aus *Abies grandis* (Küstentanne) mit einer Sequenzidentität von 70-95 % auf Aminosäureebene völlig verschiedene Reaktionen, während Enzyme aus anderen Pflanzenarten, die eine Aminosäureidentität von weniger als 30 % zu den Koniferenenzymen besitzen, die gleichen Produkte bilden können.⁵⁴ Aus diesem Grund ist es nicht möglich, die katalytische Funktion einer Terpensynthase anhand ihrer Primärstruktur vorherzusagen.

1.3.2 Reaktionsmechanismus der Sesquiterpensynthasen

Die Umwandlung der azyklischen Vorstufe (2E,6E)-Farnesyldiphosphat (**22**, FDP) in die Ringsysteme der Sesquiterpene wird von Sesquiterpensynthasen vermittelt. Alle bisher bekannten Sesquiterpene lassen sich auf ca. 300 Kohlenstoffgrundgerüste zurückführen. Die Vielfalt der Produkte, die von einem einzelnen Enzym generiert werden, kann extrem variieren. Neben hochspezifischen Enzymen wie der δ -Cadinensynthase aus der Baumwolle (*Gossypium arboreum*), welche nur ein einziges Produkt freisetzt, gibt es Multiproduktenzyme die bis zu 52 verschiedene Verbindungen bilden.^{55,56} Es wird angenommen, dass die Fähigkeit zur Bildung einer großen Anzahl von Produkten aus nur einem Substrat vorwiegend dem ungewöhnlichen elektrophilen Reaktionsmechanismus dieser Enzyme geschuldet ist. Gleichzeitig reflektiert dies das Bestreben der Natur, aus einem möglichst kleinen Pool an Ausgangsverbindungen die größtmögliche Anzahl an Reaktionsprodukten zu erhalten.⁵⁷⁻⁵⁹

Die Reaktionskaskaden der Sesquiterpensynthasen werden durch die metallvermittelte Abspaltung der Diphosphatgruppe von (2E,6E)-FDP (**22**) eingeleitet. Das hochreaktive

transoide Farnesylierung (**24**) kann anschließend verschiedene Zyklisierungen und Umlagerungen, wie Methyl- oder Hydridverschiebungen durchlaufen. Aufgrund geometrischer Restriktionen kann das *transoide* Farnesylierung (**24**) nur die distale C10-C11-Doppelbindung elektrophil angreifen, wodurch entweder das (2*E*,6*E*)-Germacrene-11-ylkation (**27**) oder das (2*E*,6*E*)-Humul-10-ylkation (**28**) entsteht (Abb. 5). Für die Überwindung der energetischen Barriere von mehr als 12 kcal mol⁻¹, die eine Rotation zum *cisoiden* Farnesylierung (**26**) verhindert, wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen.⁶⁰⁻⁶² Der allgemein akzeptierte Mechanismus geht davon aus, dass das im ersten Schritt freigesetzte Diphosphatanion an Position C3 wieder eingefangen wird, wobei das tertiäre allylische Intermediat Nerolidyldiphosphat (**25**) generiert wird. Eine Rotation um die neu geformte C2-C3-Sigma-Bindung und die anschließende Dephosphorylierung liefern letztendlich das (2*Z*,6*E*)-Farnesylierung (**26**) (Abb. 5).⁶³ Dieser Mechanismus ist analog zu der vorgelagerten Isomerisierung von (2*E*)-GDP zum (2*Z*)-Nerylkation, über das intermediär gebildete Linalyldiphosphat, welche erst die Synthese zyklischer Monoterpene ermöglicht.^{60,64} Ausgehend vom *cisoiden* Farnesylierung (**26**) wird die Bildung von Molekülen mit einer (*Z*)-konfigurierten Doppelbindung möglich, die aus dem elektrophilen Angriff auf die mittelständige C6-C7- bzw. die distale C10-C11-Doppelbindung resultieren. Dabei gehen aus dem

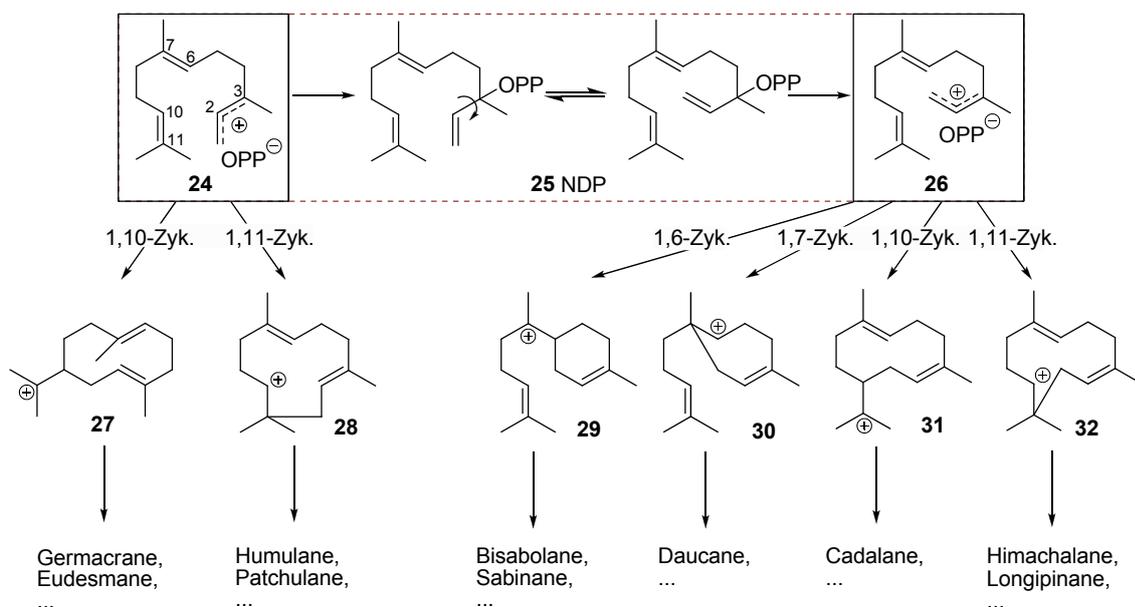


Abb. 5. Mögliche Zyklisierungen des (2*E*,6*E*)- bzw. (2*Z*,6*E*)-Farnesylierung (24**, **26**) und einige daraus resultierende Kohlenstoffgrundgerüste der Sesquiterpene.**

Bisabolylkation (**29**), Cycloheptenylkation (**30**), (2*Z*,6*E*)-Germacren-11-ylkation (**31**) und dem (2*Z*,6*E*)-Humul-10-ylkation (**32**) unter anderem die Bisabolane, Daucane, Cadalane und Himachalane hervor (Abb. 5). Die Produkte werden entweder durch Eliminierung eines Protons (Sesquiterpenkohlenwasserstoffe) oder durch Reaktion mit einem Wassermolekül (Sesquiterpenalkohole) freigesetzt.

Eine weitere Möglichkeit, Zyklisierungen zu initiieren, besteht in der Protonierung enzymgebundener neutraler Intermediate. Das am eingehendsten untersuchte Beispiel ist Germacren A (**36**), das als Intermediat in der Biosynthese von 5-*epi*-Aristolochen (**37**) auftritt, die von der 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS) aus *Nicotiana tabacum* (Tabak) katalysiert wird (Abb 7).⁶⁵ Das makrozyklische Sesquiterpen **36** wird dabei durch Abspaltung der Diphosphatgruppe von (2*E*,6*E*)-FDP (**22**), nachfolgendem C1-C10-Ringschluss und abschließenden Verlust eines Proton von der C12-Methylgruppe gebildet. Der elektrophile Angriff eines Protons auf die C6-C7-Doppelbindung des neutralen Intermediates löst eine weitere Reaktionskaskade aus, die über eine C1-C7-Zyklisierung, die Verschiebung einer Methylgruppe im Sinne einer Wagner-Meerwein-Umlagerung und Deprotonierung an C8 das Hauptprodukt 5-*epi*-Aristolochen (**37**) liefert. Als weitere neutrale Zwischenstufen wurden α -Humulen in der Pentalen-⁶⁶, β -Bisabolen in Macrocarpen-⁶⁷ oder Patchoul-4(12)-en in der Patchoulialkoholbiosynthese⁶⁸ identifiziert. Für andere Gruppen von Sesquiterpenen wurden als biogene Intermediate Verbindungen mit einem Germacran-Grundgerüst vorgeschlagen. Arigoni postulierte 1975 einen Biosyntheseweg für Cadalan-Sesquiterpene, der Germacren D (**34**) als Intermediat beschrieb (Abb. 6, A).⁶⁹ Der Schlüsselschritt der Reaktionssequenz beinhaltet die konformelle Änderung des neutralen Intermediates Germacren D (**34**) von der *cisoiden* in die *transoide* Struktur, aus der nach Reprotonierung der exozyklischen Methylengruppe eine (*Z*)-konfigurierte C2-C3-Doppelbindung entsteht. Dieser Weg umgeht die geometrische Barriere, die eine direkte C1-C10-Zyklisierung von FDP (**22**) zu zehngliedrigen Ringsystemen mit (*Z*)-konfigurierten C2-C3-Doppelbindungen verhindert. Bisher konnte die Existenz dieses Biosyntheseweges experimentell nicht nachgewiesen werden. Stattdessen konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Zyklisierung anderer Cadalan-Sesquiterpene wie Cubenen⁷⁰, 1-*epi*-Cubeno⁷¹ und δ -Cadinen⁷² über die Zwischenstufe Nerolidyldiphosphat (**25**, NDP) verläuft (Abb. 6, B). In diesen Fällen wird das (2*Z*,6*E*)-Germacren-1-ylkation (**33**), der direkte Vorläufer der Cadalane, durch einen 1,3-Hydrid-Shift erzeugt. Desweiteren wurde ein

Biosyntheseweg für **33** vorgeschlagen, der über die Protonierung des Cyclopropanring-systems von Isobicyclogermacren (**35**) verläuft (Abb. 6, C).⁶⁹

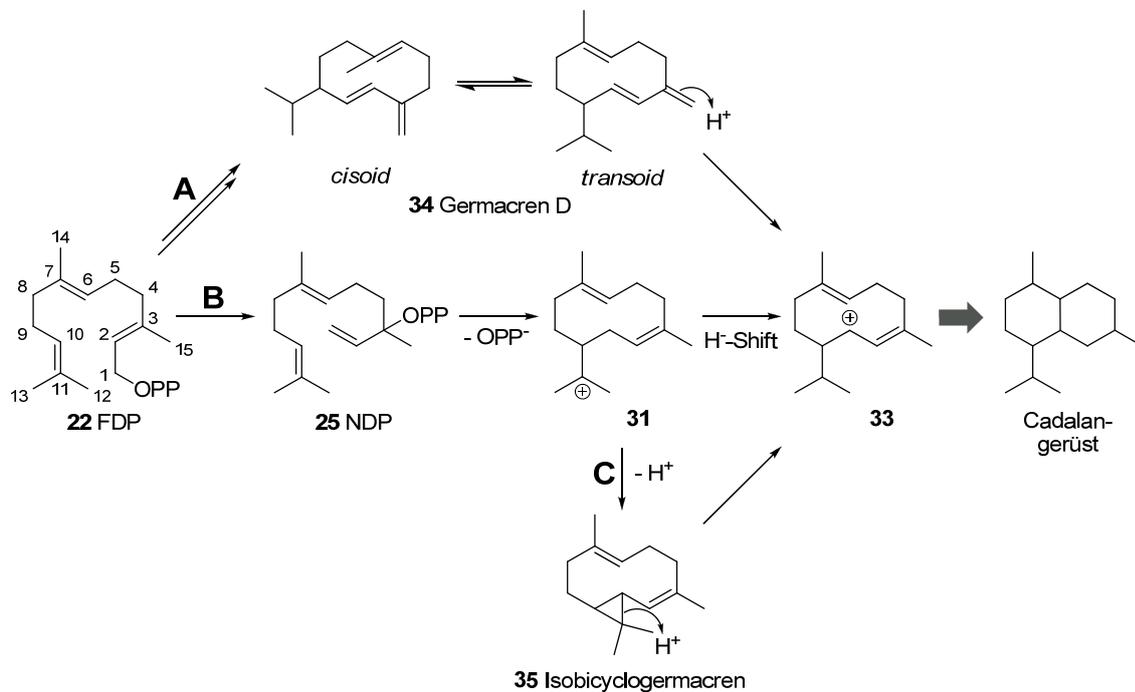


Abb. 6. Mögliche Biosynthesewege zu Cadalan-Sesquiterpenen.

1.3.3 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Anhand von Kristallstrukturen, die in den letzten Jahren veröffentlicht wurden, konnten tiefe Einblicke in die Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Terpensynthasen gewonnen werden.⁵² Ein Vergleich der verschiedenen Tertiärstrukturen zeigte, dass Typ-I Terpensynthasen strukturell sehr nah mit Prenyldiphosphatsynthasen verwandt sind, die die Substrate für Terpensynthasen liefern. Diese strukturelle Homologie ist ein weiterer Beleg für die Hypothese, dass Enzyme, die aufeinanderfolgenden Schritte in einem biosynthetischen Weg katalysieren, einen gemeinsamen evolutionären Ursprung besitzen.⁷³ Beide ausschließlich aus α -Helices aufgebauten Enzymklassen tragen hochkonservierte Motive, die unter anderem für die Koordination eines trinuklearen Magnesiumkomplexes verantwortlich sind. Die für die Enzymkatalyse essentiellen Magnesiumionen werden im Falle der Sesquiterpensynthasen über die Aminosäureseitenketten des hochkonservierten DDXXD/E-Motives und über die Konsensussequenz (L,V)(V,L,A)(N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXXE („NST/DTE-Motiv“, hervorgehoben sind die Liganden der Mg^{2+} -Ionen) gebunden.^{74,75} Beide Motive liegen

sich direkt gegenüber und sind am Eingang des aktiven Zentrums lokalisiert, welches von sechs α -Helices (Helix C, D, F, G, H und J) sowie zwei an der Oberfläche des Proteins befindlichen Schleifen (A-C-Loop und J-K-Loop) gebildet wird. Kristallstrukturen verschiedener Sesquiterpensynthasen, welche mit anorganischem Diphosphat bzw. Substratanaloga komplexiert wurden, zeigten signifikante strukturelle Änderungen gegenüber den nativen Enzymen ohne Liganden. Die Interaktionen mit den anionischen Diphosphaten führten zu einer Neuordnung der A-C- und J-K-Loops, wodurch die aktive Tasche verschlossen und für das umgebende Lösungsmittel unzugänglich wurde.⁷⁵⁻⁷⁷ Während der Eingang des aktiven Zentrums hauptsächlich von polaren Aminosäuren gebildet wird, die den ionischen Teil des Substrates verankern, ragt der aliphatische Rest tief in die Enzymtasche hinein, die von hydrophoben Seitenketten dominiert wird. Die π -Elektronen aromatischer Aminosäureseitenketten wie Phenylalanin, Tyrosin oder Tryptophan stabilisieren während des Reaktionsverlaufs die auftretenden kationischen Intermediate über Kation- π - bzw. Quadrupolwechselwirkungen.^{57,78} Des Weiteren bestimmt die Form des aktiven Zentrums in der geschlossenen Konformation entscheidend die Spezifität der Produktbildung und die Toleranz gegenüber verschiedenen Substraten. So dient die Enzymtasche einer hochspezifischen Terpensynthase als präzise Vorlage, die das flexible Substrat und die kationischen Intermediate durch eine Folge von hochgeordneten Konformationen leitet, woraus ein einzelnes Produkt mit definierter Stereochemie resultiert. Im Gegensatz dazu besitzt das Substrat im aktiven Zentrum eines Multiproduktenzyms mehr Freiheitsgrade, wodurch Nebenreaktionen wie der vorzeitige Abbruch von Reaktionswegen oder alternative Substratkonformationen zugänglich werden.^{52,79,80} Die Veränderung der Oberfläche des aktiven Zentrums und die damit einhergehende Beeinflussung der Produktspezifität kann einerseits durch Mutagenese von Aminosäureresten im aktiven Zentrum oder durch den Austausch weiter entfernter Aminosäuren erreicht werden.^{81,82} Durch eine Vielzahl von *in vitro*-Mutagenesestudien konnten einzelnen Aminosäuren bzw. Gruppen von Aminosäuren im aktiven Zentrum spezifische Funktionen zugeordnet werden. Dies soll im Folgenden am Beispiel der Protonentransferreaktionen auf neutrale enzymgebundene Intermediate gezeigt werden. Die 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS) aus Tabak war die erste pflanzliche Terpensynthase deren Kristallstruktur gelöst wurde.⁸³ Das Enzym katalysiert die Bildung von 5-*epi*-Aristolochen (**37**) ausgehend von (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) über die neutrale Zwischenstufe Germacren A (**36**), das vorab über eine C1-C10 Zyklisierung und anschließende

Eliminierung eines Protons von der C12-Methylgruppe generiert wird. Die Aktivierung des makrozyklischen Intermediates durch Protonierung und nachfolgende C2-C7-Zyklisierung führen zum Eudesmanylikation. Ein 1,2-Hydrid-Shift, die Umlagerung einer Methylgruppe von C7 zu C2 sowie die Deprotonierung an C8 ergeben das Endprodukt *5-epi*-Aristolochen (**37**) (Abb 7).⁶³ Ausgehend von der TEAS-Kristallstruktur postulierten Starks *et al.* eine für die Protonierung verantwortliche katalytische Triade, die aus zwei Aspartatresten (Asp444, Asp526) und einem Tyrosinrest (Tyr520) besteht.⁸³ Die zentrale Rolle als Protonenüberträger auf das Kohlenstoffatom C6 des Germacren A (**36**) sollte dabei die Tyrosinseitenkette übernehmen. Durch die Konstruktion einer Mutante, bei der die phenolische Hydroxylgruppe fehlt (Y520F-Mutante) konnte diese Annahme bekräftigt werden. Der Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin resultierte in einem Protein, das als einziges Produkt Germacren A (**36**) bildete, dem postulierten neutralen Intermediat.⁸⁴ Eine ähnliche Funktion konnte einem im aktiven Zentrum einer Maisterpensynthese (TPS11) lokalisierten Tyrosinrest zugeordnet werden. Die Reaktionssequenz der Sesquiterpensynthese TPS11 verläuft über die neutrale Zwischenstufe (*S*)- β -Bisabolen. Die Protonierung des Intermediates an C10 initiiert einen C14-C10-Ringschluss, der nachfolgende Verlust eines Protons an C8 führt zum Hauptprodukt (*S*)- β -Macrocarpen.⁸⁵ Im Gegensatz zu TEAS konnte in der Macrocarpensynthese nur eine

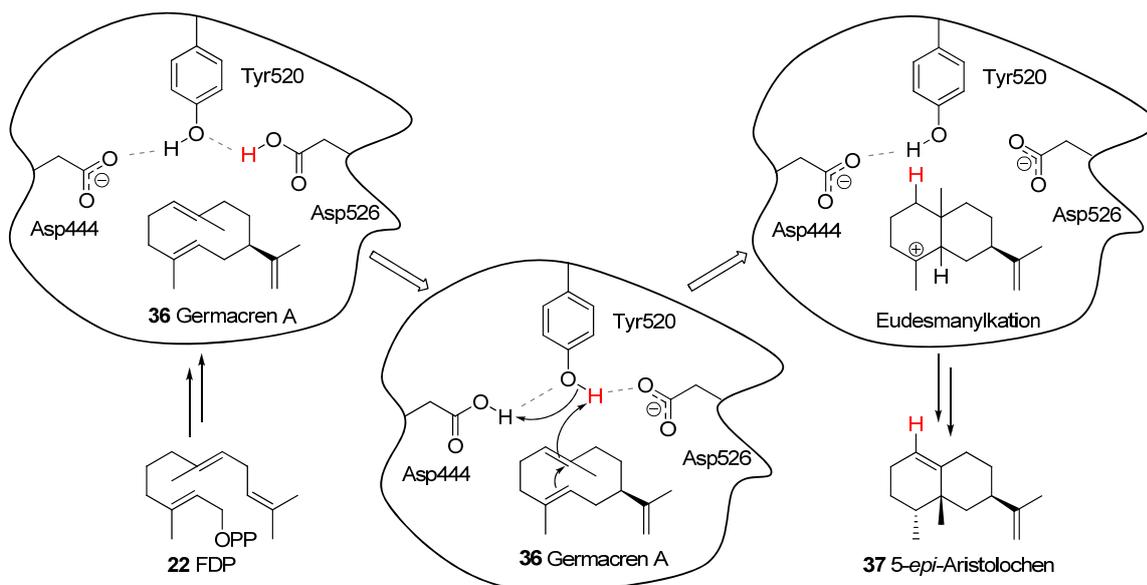


Abb 7. Mechanistisches Modell für die Übertragung eines Protons auf Germacren A (**36**) während der *5-epi*-Aristolochenbiosynthese, das von Starks *et al.* postuliert wurde.⁸³

katalytische Diade identifiziert werden, die aus einem Tyrosin- (Tyr522) und einem Aspartatrest (Asp526) besteht. Der Tausch der Aspartat- gegen eine Asparaginseitenkette (D526N-Mutante) resultierte in einer kompletten Inaktivierung des Enzyms, was darauf schließen lässt, dass Asp526 für frühe Stufen der Produktbildung von essentieller Bedeutung ist. Der Ersatz des Tyrosin durch ein Phenylalanin führte, ähnlich wie bei TEAS, zu einer dramatischen Reduktion der Enzymaktivität und der Freisetzung von (*S*)- β -Bisabolon als einzigem Produkt.⁶⁷ Diese Ergebnisse liefern weitere Belege für die zentrale Rolle der phenolischen OH-Gruppe bei Protonenübertragungsreaktionen.

1.4 Induzierte Duftstoffe der Modellpflanze *Medicago truncatula*

Bis vor wenigen Jahren wurde in der Pflanzengenomforschung vor allem *Arabidopsis thaliana* aus der Familie der Kreuzblütler bearbeitet, deren Genom als erstes entschlüsselt werden konnte. Allerdings ist *A. thaliana* als Kreuzblütler nicht in der Lage, Wurzelknöllchensymbiosen einzugehen und gehört außerdem zu den wenigen Pflanzen die keine Mykorrhizasymbiose ausbilden können. Deswegen wurde innerhalb der Leguminosen nach einer geeigneteren Modellpflanze gesucht. In den letzten Jahren wurden mit dem Hornklee *Lotus japonicus* und mit *Medicago truncatula*, einer am Mittelmeer beheimateten Verwandten der Luzerne, solche Modell-Leguminosen identifiziert. Insbesondere *M. truncatula* ist nah verwandt mit landwirtschaftlich bedeutenden Futter- und Körnerleguminosen, die aufgrund ihrer ungewöhnlich großen Genome als Modellpflanzen ausschieden.^{86,87} Neben dem relativ kleinen Genom (~ 500 Mbp) zeigt *M. truncatula* weitere Charakteristika die Modellpflanzen auszeichnen wie den kurzen Lebenszyklus (2-3 Monate), die Selbstbefruchtung und die Diploidität.⁸⁸ Neben dem genetischen und physiologischen Studium der leguminosenspezifischen Phänomene, wie Pflanzen-Mikroben-Interaktionen oder symbiontischer Stickstofffixierung, sind auch die Verteidigungsstrategien von *M. truncatula* gegenüber Fressfeinden in den Blickpunkt verschiedener Untersuchungen gerückt. Pflanzen haben im Laufe der Evolution ein breites Spektrum an Abwehrmechanismen entwickelt, um sich gegen Herbivore zu verteidigen. Neben der direkten Abwehr, die einen sofortigen negativen Effekt auf die Angreifer ausübt, gibt es

auch indirekte Abwehrmechanismen an denen Organismen höherer trophischer Stufen beteiligt sind.⁸⁹⁻⁹¹ Beide Strategien können entweder konstitutiv oder induziert sein. Im Gegensatz zur permanenten Produktion von Toxinen und Wehrchemikalien, ist die induzierte chemische Verteidigung wesentlich ressourcenschonender und vermeidet Überproduktion nicht benötigter Verbindungen. So reagiert *M. truncatula* auf den Befall von Herbivoren mit der Freisetzung eines breiten Spektrums an flüchtigen Verbindungen, wobei terpenoide Verbindungen, wie Monoterpene (C10), Sesquiterpene (C15) und Homoterpene (C11 oder C16), die Hauptbestandteile bilden.⁹² Dabei sind die Duftprofile charakteristisch für den jeweiligen Schädling. Beispielsweise induziert die fressende Larve von *Spodoptera littoralis* ein weitaus größeres Spektrum an flüchtigen Substanzen, als die pflanzensaftsaugende Spinnmilbe *Tetranychus urticae*, wobei sich die Produktzusammensetzungen der emittierten Duftbouquets sowohl quantitativ als auch qualitativ unterscheiden. Ähnliche Effekte konnten bei der Induktion von terpenoiden Duftprofilen festgestellt werden, die *M. truncatula* nach der Behandlung mit *nod*-Faktoren, pilzlichen Chitosanfragmenten oder 1,6-1,3-*oligo*- β -Glucanen freisetzt.⁹³ Des Weiteren beeinflusst die Behandlung mit unterschiedlichen chemischen Elicitoren, wie mit dem Ionenkanalbildenden Peptid Alamethicin, Cu^{2+} -Ionen oder Jasmonaten die Terpenbiosynthese in charakteristischer Weise. Mit Hilfe von Clusteranalysen, einem Verfahren der statistischen Analyse, konnte zwischen den einzelnen Duftprofilen unterschieden und den entsprechenden Auslöserorganismen bzw. Elicitoren zugeordnet werden.⁹³ Daraus lässt sich ableiten, dass die Terpenbiosynthese flüchtiger Verbindungen in komplexer Weise auf ober- und unterirdische Ereignisse reagiert, die von Mikroben und Herbivoren ausgelöst werden. Im Allgemeinen wird angenommen, dass die Regulation der Terpenbildung auf Transkriptebene der Terpensynthasegene erfolgt, wobei die Regulationsmechanismen teilweise sehr komplex sind.^{53,94,95} Aufgrund der vorhandenen genetischen Informationen von *M. truncatula* konnten bisher sechs potentielle Terpensynthasegene identifiziert werden (*MtTPS1-MtTPS6*). Sequenzanalysen und Chloroplast-Import-Assays lassen vermuten, dass die Gene von *MtTPS1* und *MtTPS2* für Sesquiterpensynthasen und die von *MtTPS3* und *MtTPS4* für Mono- oder Diterpensynthasen kodieren.⁹⁶ Tatsächlich konnte *MtTPS4* funktionell in *E. coli* exprimiert und als (*E*)- β -Ocimensynthase (Monoterpensynthase) identifiziert werden.⁹⁷ Die für *MtTPS5* und *MtTPS6* kodierenden Sequenzabschnitte wurden in unserer Arbeitsgruppe von G.-I. Arimura isoliert.⁹⁸ Die starke und schnelle Akkumulation der

mRNA in Folge mechanischer Verwundung, lässt die Beteiligung der identifizierten Terpensynthasegene an der Pflanzenabwehr gegenüber Herbivoren vermuten.⁹⁶⁻⁹⁸ Detaillierte Untersuchungen an der (*E*)- β -Ocimensynthase (MtTPS4) zeigten, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der erhöhten Freisetzung von (*E*)- β -Ocimen und der Transkriptakkumulation des *MtTPS4*-Gens besteht. Dies legt die Vermutung nahe, dass der Befall mit Herbivoren die Expression der Terpensynthasegene induziert, wonach eine vermehrte Emission von flüchtigen Verbindungen folgt.⁹⁷ Weitere Einblicke in die Regulationsmechanismen und frühen Signalwege, die die Produktion der Terpene induzieren, wurden durch den Vergleich der Ethylen-insensitiven Mutante *skl* mit dem Wildtypen von *M. truncatula* erhalten.⁹⁸

2 Zielstellung

Bisherige Arbeiten zeigten, dass *Medicago truncatula* unter dem Einfluss verschiedener biotischer und abiotischer Faktoren komplexe Terpengemische bildet.^{92,93} Die qualitative und quantitative Zusammensetzung dieser Gemische, die hauptsächlich von Sesquiterpenen dominiert werden, ist hierbei von der Art des Herbivoren bzw. des Elicitors abhängig. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Duftstoffbiosynthese durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Signalwege reguliert wird.⁹⁸ Im Rahmen dieser Arbeit sollen erstmalig die Schlüsselenzyme der Terpenbiosynthese in *M. truncatula* näher untersucht werden. Dazu sollen die Terpensynthasen identifiziert und nach heterologer Expression in *E. coli* funktionell charakterisiert werden, um daraus Aussagen über die Beteiligung der Enzyme an der Bildung bestimmter Duftstoffprofile abzuleiten. Im Fokus dieser Arbeit steht die Untersuchung der Reaktionsmechanismen der einzelnen Terpensynthasen mit Hilfe klassischer chemischer Methoden, wie der Synthese von markierten Substraten bzw. artifizieller Substratanaloga. Eine weitere Aufgabe stellt die Bestimmung der Absolutkonfiguration der Produkte zur Identifikation des genauen stereochemischen Verlaufs der Zyklisierungskaskaden und die enzymatische Kontrolle der einzelnen Reaktionskanäle dar. Zusätzlich sollen durch Strukturmodellierung und *in vitro*-Mutagenese Einblicke in die katalytischen Mechanismen der Terpensynthasen und deren strukturelle Grundlagen erhalten werden.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung und Expression von drei Terpensynthasegenen aus *Medicago truncatula*

Zur Charakterisierung der katalytischen Aktivität der Proteine, für die die isolierten Gene *MtTPS1*, *MtTPS3* und *MtTPS5* aus *Medicago truncatula* kodieren, wurden deren Genabschnitte in den Expressionsvektor pHis8-3⁹⁹ inseriert und das resultierende Konstrukt in *Escherichia coli* transformiert. Die Ausbeuten an heterolog exprimierten Protein waren dabei sehr unterschiedlich; *MtTPS1* und *MtTPS3* wurden zu einem sehr geringen Maße produziert, wohingegen sich *MtTPS5* stark in den Zellen anreicherte (Abb. 8). Um einerseits die Beeinflussung der Produktbildung durch *E. coli*-Enzyme auszuschließen und andererseits die schwach exprimierten Proteine aufzukonzentrieren,

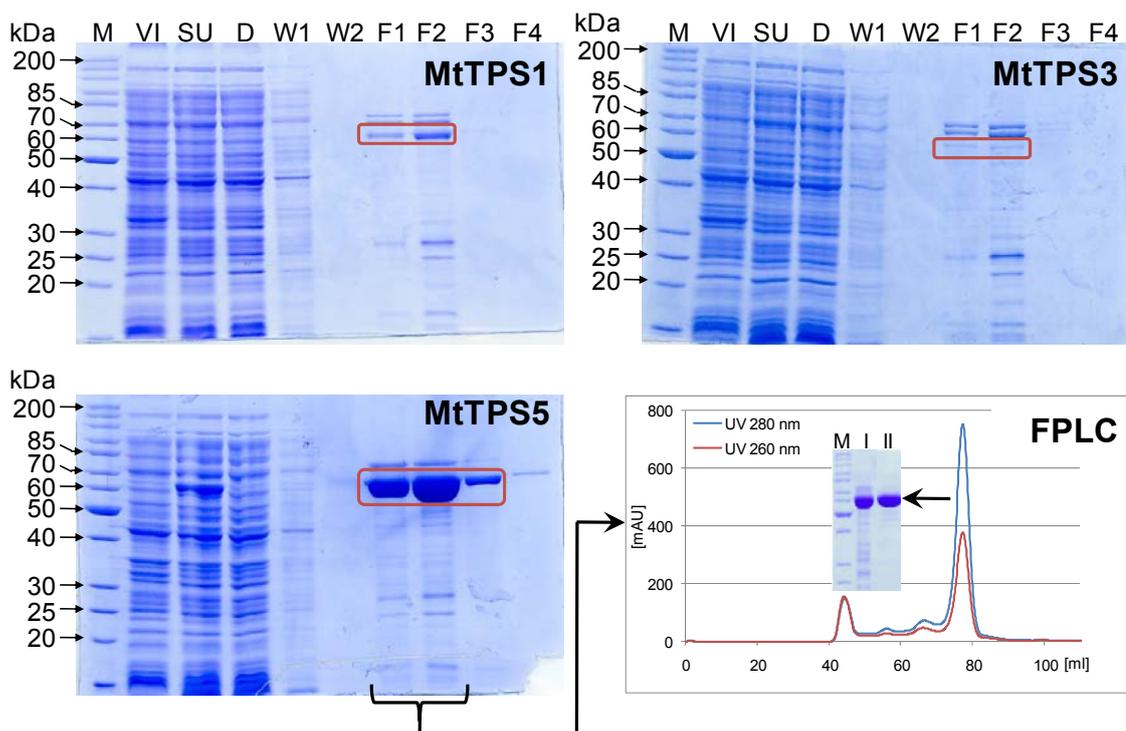


Abb. 8. Aufreinigung der Terpensynthasen *MtTPS1*, *MtTPS3* und *MtTPS5* die als Fusionsprotein mit N-terminalem His-tag in *E. coli* exprimiert wurden. Die SDS-Gele dokumentieren die einzelnen Reinigungsschritte der Affinitätschromatographie (Ni-NTA-Säule): (M): Marker, (VI): Bakterienkultur vor der Induktion mit IPTG, (SU): bakterieller Rohextrakt, (D): Durchlauf der Ni-NTA-Säule, (W1) und (W2): Waschschrte 1 und 2 der Ni-NTA-Säule, (F1) bis (F4): Elutionsfraktionen 1 bis 4 der Ni-NTA-Säule. FPLC: Chromatogramm der Gelfiltration der vereinigten Elutionsfraktionen (F1+F2) von *MtTPS5* über eine Superdex200-Säule. Die Reinheit des Proteins wurde über eine SDS-PAGE kontrolliert; (I): vor, (II): nach der Gelfiltration.

wurde die N-terminale His-Markierung (His-tag) für die der pHIS8-3 Vektor kodiert, ausgenutzt. Durch Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Säulen konnten die Proteine stark angereichert werden (Abb. 8). Im Mittel konnten pro Liter *E. coli* Kultur etwa 0,5 g MtTPS1 oder MtTPS3 Protein bzw. 5 g MtTPS5 Protein gewonnen werden, wobei MtTPS1 und MtTPS3 im Verhältnis zu MtTPS5 wesentlich stärker mit *E. coli*-Enzymen verunreinigt waren. Für kinetische Untersuchungen bei denen eine genaue Kenntnis der Proteinkonzentration eine Voraussetzung ist, wurde das rekombinante MtTPS5 Protein einem weiteren Reinigungsschritt unterzogen. Durch Gelfiltration mit einem FPLC-System konnte die Reinheit auf über 90 % gesteigert werden (Abb. 8).

3.2 Substratspezifität von MtTPS1, MtTPS3 und MtTPS5

Da es zurzeit nur bedingt möglich ist, auf Grundlage der Aminosäuresequenz zu entscheiden, ob es sich bei den heterolog exprimierten Enzymen um Mono-, Sesqui- oder Diterpensynthasen handelt, wurde die Enzymaktivität in Anwesenheit der jeweiligen Substrate untersucht. Die Produkte wurden mittels GC-MS analysiert und anhand ihrer Retentionsindizes (RI) und Massenspektren im Vergleich zu authentischen Referenzen identifiziert (Anhang Tab. A-1). MtTPS1, MtTPS3 und MtTPS5 akzeptierten sowohl (2*E*)-Geranyldiphosphat (**21**, GDP) und (2*E*,6*E*)-Farnesyldiphosphat (**22**, FDP) als Substrat, die mit unterschiedlicher Effektivität jeweils zu Mono- und Sesquiterpenen umgewandelt wurden. Die Bildung von Diterpenen aus (2*E*,6*E*,10*E*)-Geranylgeranyldiphosphat (**23**, GGDP) konnte nur für MtTPS3 beobachtet werden. Die Produktspektren der Monoterpene von MtTPS1 und MtTPS5 zeigten eine sehr große Ähnlichkeit und wurden von Myrcen (**38**), Limonen (**41**) und Terpinolen (**45**) dominiert (Abb. 9). Die Inkubation von MtTPS1 mit (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) lieferte (-)-(*E*)- β -Caryophyllen (**53**) (92 %) und α -Humulen (**56**) als einzige Sesquiterpenprodukte. Im Gegensatz dazu konnten im Produktspektrum von MtTPS5 nach Umsetzung mit (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) 27 verschiedene Sesquiterpene identifiziert werden, wobei der Alkohol Cubebol (**64**) (38,2 %) das Hauptprodukt darstellte.

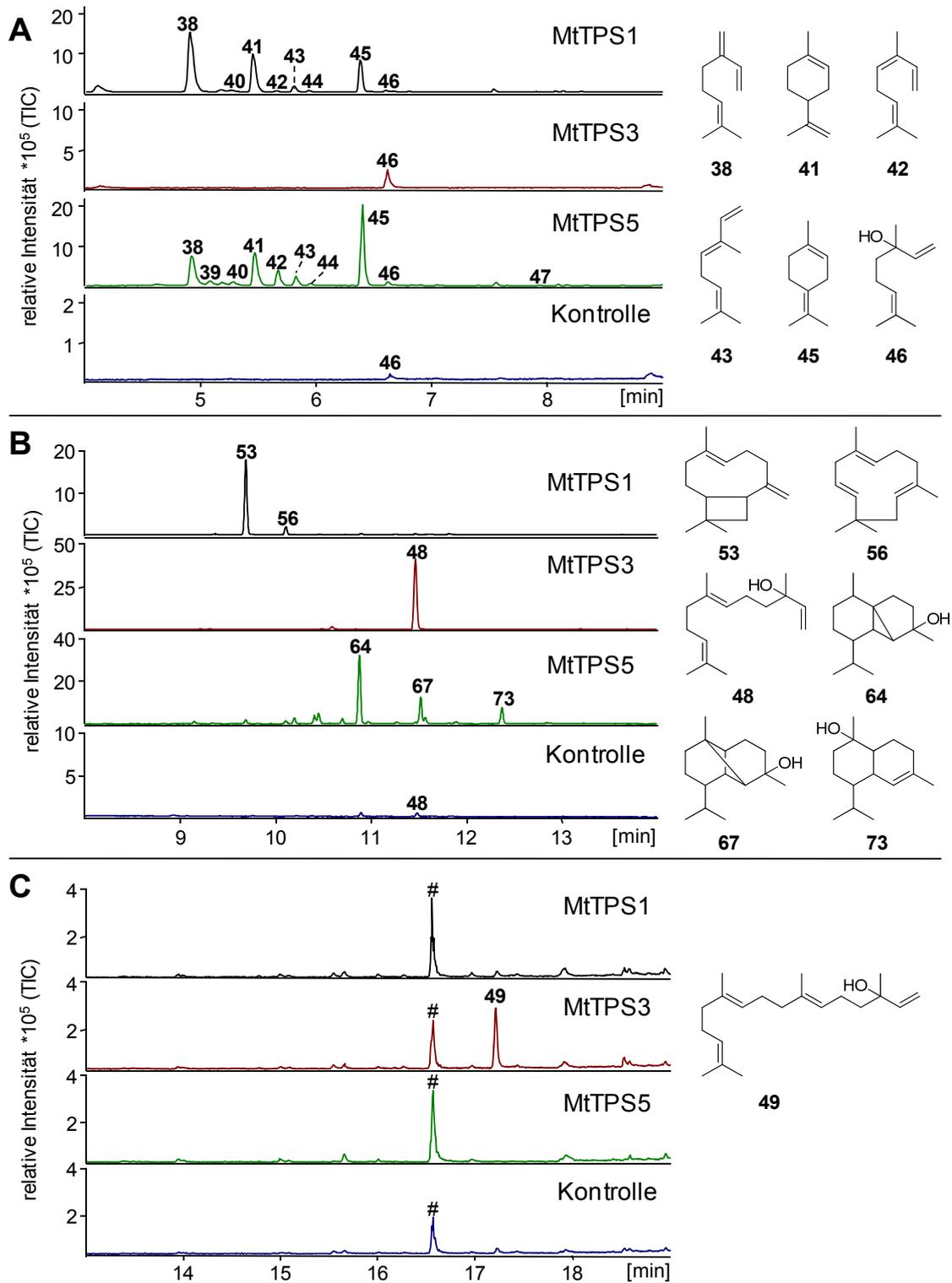


Abb. 9. GC-MS Chromatogramme der Produkte der rekombinanten Terpensynthasen aus *Medicago truncatula* nach der Inkubation mit (2E)-GDP (A), (2E,6E)-FDP (B) und (2E,6E,10E)-GGDP (C). Als Kontrolle diente ein *E. coli*-Rohextrakt mit dem leeren Vektor. In dieser Abbildung sind nur die Hauptprodukte (Strukturformeln neben den Chromatogrammen) und die wichtigsten Nebenprodukte markiert. (A): 38 Myrcen, 39 C₁₀H₁₆-I, 40 C₁₀H₁₆-II, 41 Limonen, 42 (Z)-β-Ocimen, 43 (E)-β-Ocimen, 44 C₁₀H₁₆-III, 45 Terpinolen, 46 Linalool, 47 α-Terpineol; (B): 48 Nerolidol, 53 (E)-β-Caryophyllen, 56 α-Humulen, 64 Cubebol, 67 Copan-3-ol, 73 Torreyol (vollständige Indizierung der MtTPS5-Sesquiterpenprodukte siehe Abb. 12); (C): 49 Geranylinalool, # Phtalsäureester (Weichmacher).

Insgesamt zeigten MtTPS1 und MtTPS5 deutlich höhere Umsatzraten mit (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) als mit (2*E*)-GDP (**21**) (~5 % im Vergleich zu **22**), was diese Enzyme als Sesquiterpensynthasen auszeichnete. Im Vergleich dazu war die Substratspezifität von MtTPS3 geringer, da dieses Enzym in der Lage war, sowohl das C₁₀-, C₁₅- als auch das C₂₀-Substrat in die entsprechenden tertiären allylischen Alkohole zu überführen (Abb. 9). Um sicher nachzuweisen, dass die detektierten hydroxylierten Verbindungen enzymatischen Ursprungs waren, erfolgte die Bestimmung der absoluten Konfigurationen mittels GC-MS an chiralen Phasen. Diese Untersuchungen zeigten,

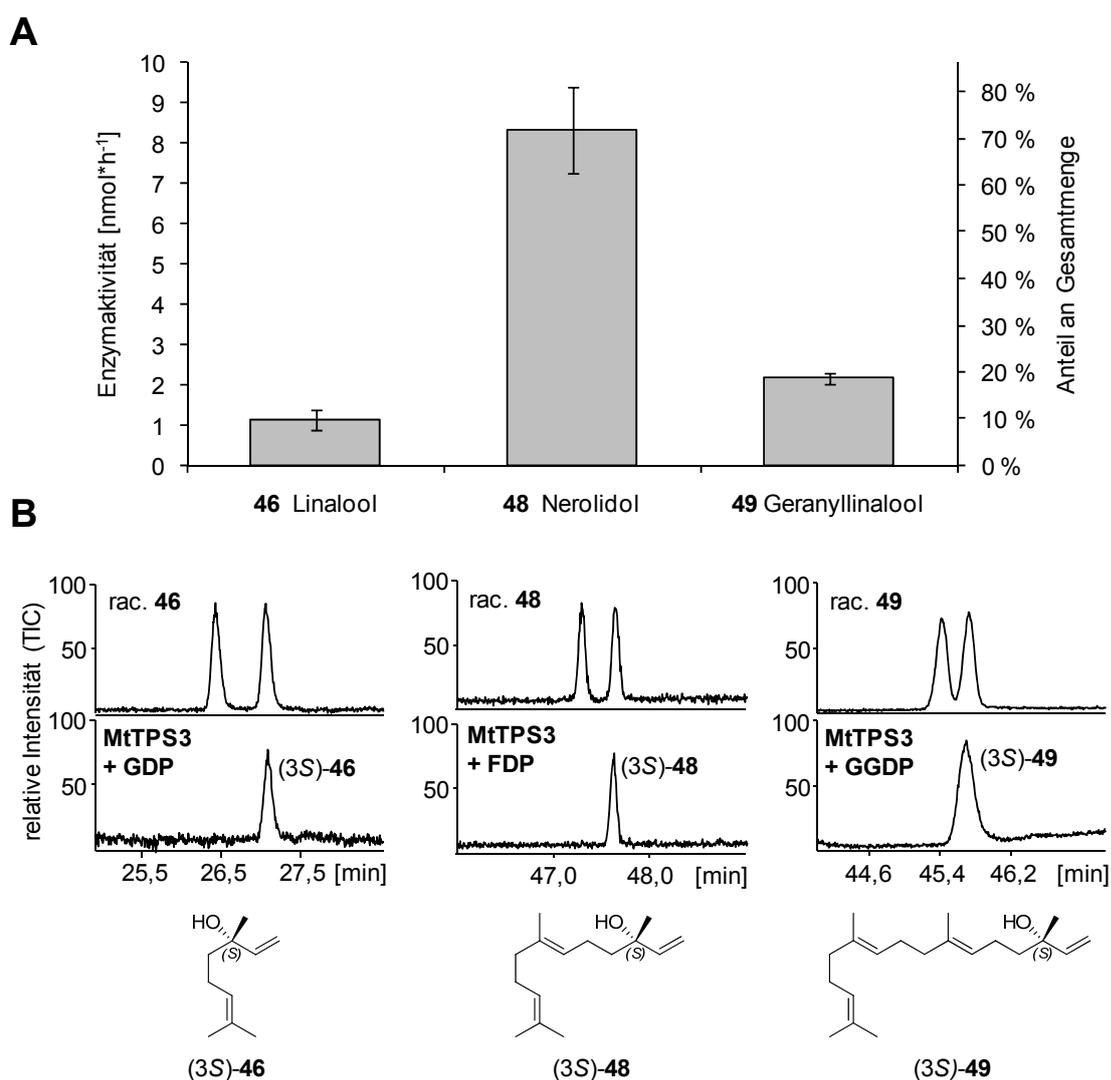


Abb. 10. Quantitative und stereochemische Analyse der Enzymprodukte von MtTPS3. (A): Quantitative Analyse der tertiären Alkohole, Linalool (**46**), Nerolidol (**48**) und Geranylinalool (**49**), die von MtTPS3 bei gleichzeitiger Inkubation mit äquimolare Mengen von (2*E*)-GDP (**21**), (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) und (2*E*,6*E*,10*E*)-GGDP (**23**) erhalten wurden. (B): Die stereochemische Analyse der Enzymprodukte von MtTPS3 erfolgte mittels GC-MS an chiraler stationärer Phase.

dass die stereogenen Zentren aller drei Alkohole an C3 ausschließlich (*S*)-konfiguriert waren (Abb. 10). Die hohe Enantiomerenreinheit und die gleiche räumliche Anordnung der Substituenten an C3 beweisen, dass es sich um eine enzymkatalysierte Reaktion handelt, die in allen drei Fällen der gleichen stereochemischen Kontrolle unterliegt. Bei einer nichtenzymatischen Hydrolyse der Substrate hätte man die Bildung eines racemischen Gemisches der tertiären Alkohole beobachten müssen. Inkubationsversuche, bei denen gleichzeitig alle drei Substrate in äquimolaren Mengen angeboten wurden, zeigte MtTPS3 eine Bevorzugung von (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) gegenüber (2*E*)-GDP (**21**) und (2*E*,6*E*,10*E*)-GGDP (**23**) in einem Verhältnis von 7:2:1 (Abb. 10). Daraus lässt sich ableiten, dass es sich bei MtTPS3 *in vitro* um eine Sesquiterpensynthase handelt. Die Funktion *in vivo* konnte in dieser Arbeit nicht adressiert werden, könnte sich aber durchaus von der hier beschriebenen unterscheiden.

3.3 Die Sesquiterpensynthase MtTPS5

3.3.1 Sesquiterpenprodukte von MtTPS5

Die Inkubation von MtTPS5 mit (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) lieferte 17 Sesquiterpenkohlenwasserstoffe und 10 Sesquiterpenalkohole, wobei Cubebol (**64**) (38,2 %) das Hauptprodukt darstellte. Von den 27 Enzymprodukten konnten 25 anhand ihrer Retentionsindizes und der Massenspektren im Vergleich zu authentischen Referenzen identifiziert werden (Anhang Tab. A-1). Für die am zweithäufigsten gebildete Verbindung **67** (14,9 %) konnte kein zufriedenstellender Vorschlag in den zugänglichen Massenspektrenbibliotheken gefunden werden, der zusätzlich dem berechneten Retentionsindex genügte. Das Molekülion von **67** lag bei $m/z = 222$ und deutete auf einen Sesquiterpenalkohol hin. Zusätzliche Informationen lieferte der Basispeak bei $m/z = 161$, der typisch für den Verlust eines Isopropylradikals und eines Wassermoleküls ist ($[M-H_2O-C_3H_7]^+$). Durch Anreicherung von **67** mittels Säulenchromatographie konnten verschiedene Reaktionen zur Bestimmung des Terpengrundgerüsts durchgeführt werden. Unter den Bedingungen einer katalytischen Hydrierung (5 % Rhodium auf Aluminium), die vergleichbare ungesättigte Sesquiterpene in gesättigte Verbindungen überführte, war keine Aufnahme von Wasserstoff durch **67** festzustellen. Daraus ließ sich ableiten, dass sich die vier

Doppelbindungseinheiten des Sesquiterpenalkohols **67** auf drei Ringe und die Hydroxyfunktion aufteilen. Die Dehydratisierung mit Trifluoressigsäureanhydrid lieferte als Hauptprodukt das trizyklische ungesättigte Sesquiterpen α -Copaen (**51**) sowie die durch weitere Umlagerung entstandenen bicyklischen Verbindungen γ -Muurolen (**59**), α -Muurolen (**62**) und δ -Cadininen (**65**) (Abb. 11). Eine Verbindung die all diesen experimentellen Befunden genügte, war Copan-3-ol (**67**), dass von Upadhyay *et al.* aus *Ocimum americanum* isoliert werden konnte.¹⁰⁰ Das als Spurenkomponente im Produktspektrum von MtTPS5 identifizierte Nerolidol (**48**), war nicht-enzymatischen Ursprungs, da es in ähnlichen Mengen im Rohextrakt von *E. coli* mit dem leeren pHIS8-3 Vektor (Kontrolle) detektiert wurde. Zusätzlich zeigten stereochemische Analysen von **48**, dass es sich um eine racemische Mischung beider optisch aktiven Isomere handelte, wie dies für einen nicht-enzymatischen Prozess zu erwarten ist.

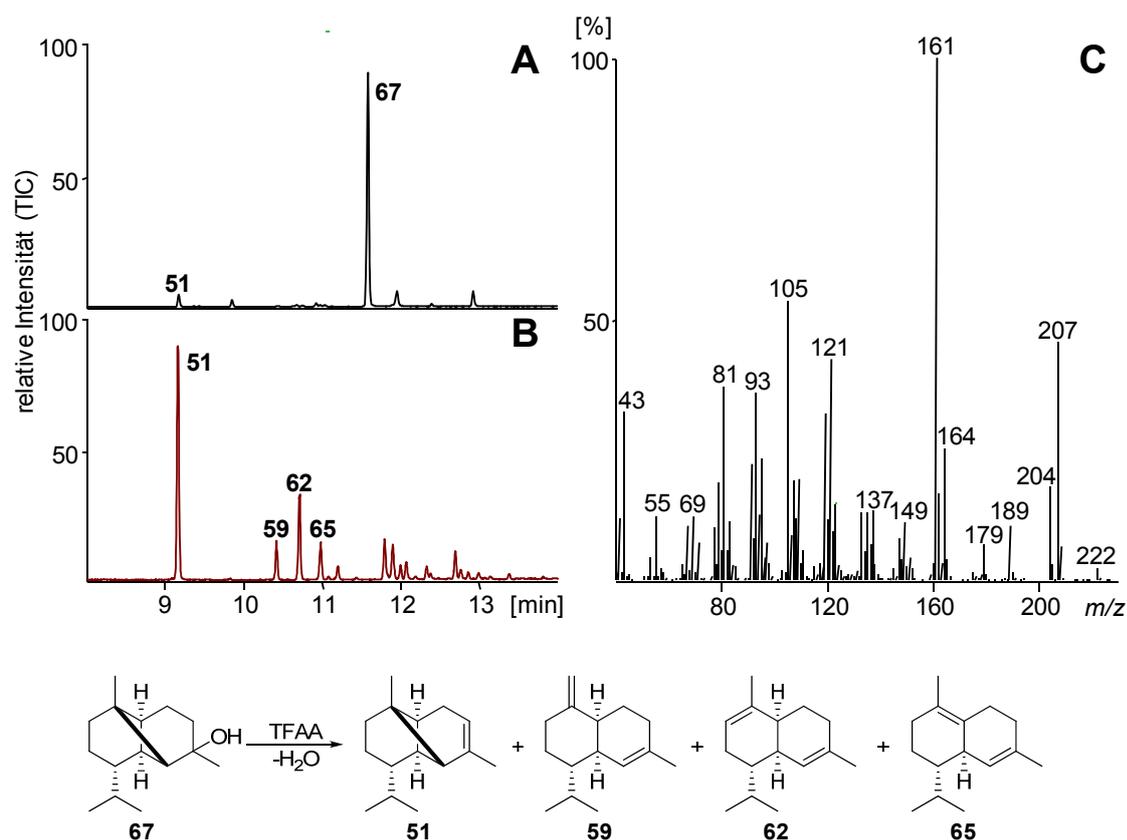


Abb. 11. Aufklärung der Struktur von Copan-3-ol (67**).** GC-MS Chromatogramme einer Copan-3-ol-reichen Fraktion, die durch säulenchromatographische Trennung eines Pentanextrakts an Kieselgel erhalten wurde, vor (**A**) und nach (**B**) der säurekatalysierten Dehydratisierung mit Trifluoressigsäureanhydrid (TFAA). Reaktionsprodukte nach Behandlung mit Säure: α -Copaen (**51**), γ -Muurolen (**59**), α -Muurolen (**62**) und δ -Cadininen (**65**). (**C**): Massenspektrum von **67**.

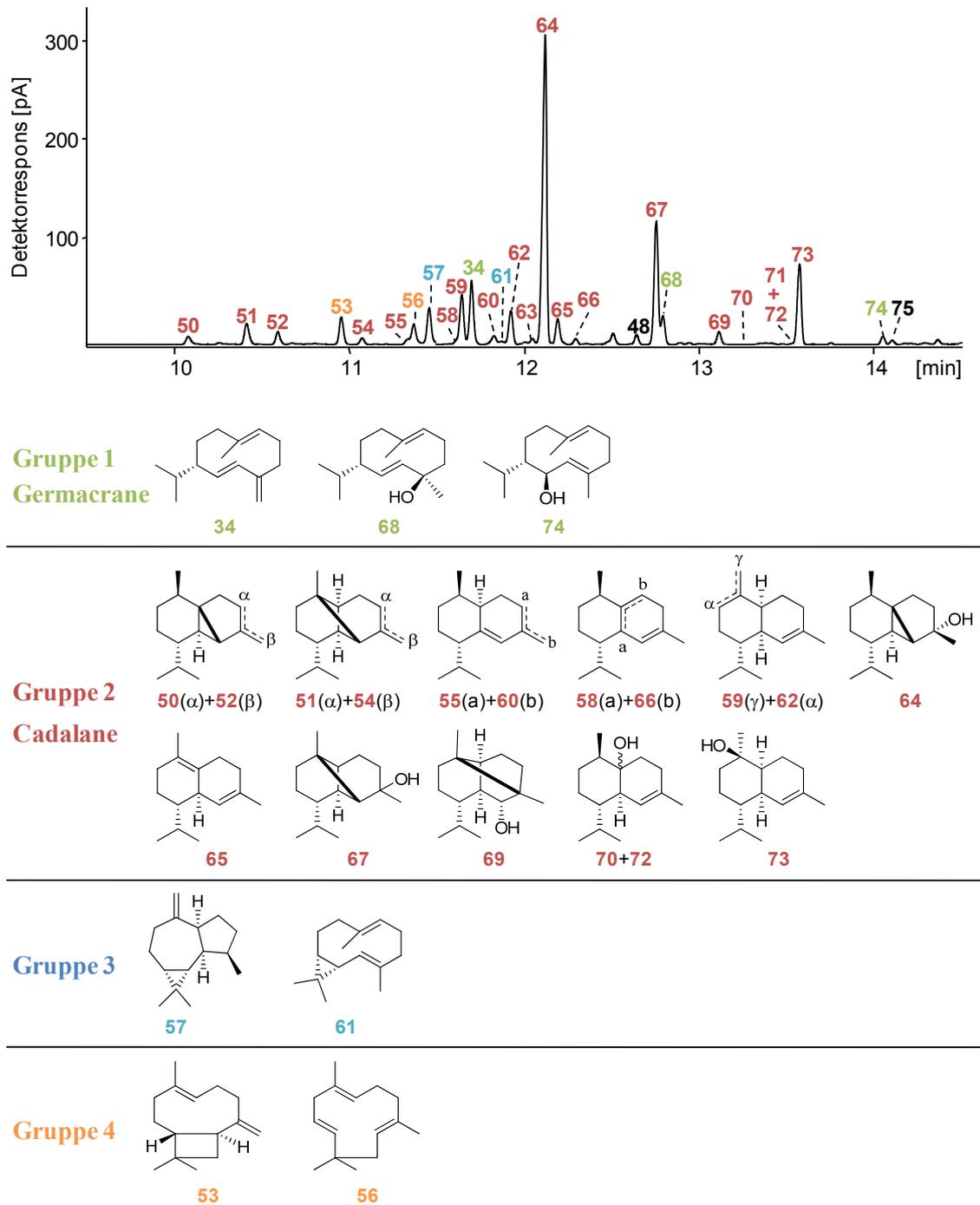


Abb. 12. GC-FID Chromatogramm der Sesquiterpenprodukte der rekombinanten MtTPS5 nach Inkubation mit (2*E*,6*E*)-FDP (22). Die Verbindungen wurden anhand ihrer Retentionsindizes und der Massenspektren im Vergleich zu authentischen Referenzen identifiziert. 50 α -Cubeben, 51 α -Copaen, 52 β -Cubeben, 53 (*E*)- β -Caryophyllen, 54 β -Copaen, 55 Cadina-3,5-dien, 56 α -Humulen, 57 *allo*-Aromadendren, 58 *trans*-Cadina-1(6),4-dien, 59 γ -Muurolen, 34 Germacren D, 60 Bicyclosesquiphellandren, 61 Bicyclogermacren, 62 α -Muurolen, 63 δ -Amorphen, 64 Cubebol, 65 δ -Cadinen, 66 Cadina-1,4-dien, 48 Nerolidol, 67 Copan-3-ol, 68 4 α -Hydroxygermacra-1(10),5-dien, 69 Copaborneol^a, 70 1-*epi*-Cubenol, 71 T-Cadinol, 72 Cubenol^a, 73 Torreyol, 74 Kunzeaol^a, 75 C₁₅H₂₆O-I (unbekannter Sesquiterpenalkohol). ^akeine Referenz verfügbar

Insgesamt können die Produkte der MtTPS5 nach ihren verschiedenen Kohlenstoff-Grundgerüsten in vier Gruppen unterteilt werden: Gruppe 1 umfasst die Germacrane, Gruppe 2 beinhaltet die Cadalane mit dem 3,7-Dimethyl-10-isopropyloctalin-Grundgerüst als gemeinsamen Strukturmerkmal, Gruppe 3 und 4 bilden jeweils die beiden Verbindungen Bicyclogermacren (**61**) und *allo*-Aromadendren (**57**) bzw. (*E*)- β -Caryophyllen (**53**) und α -Humulen (**56**) (Abb. 12). Das Produktspektrum wurde von den Terpenen der Gruppe 2 dominiert, die insgesamt etwa 82 % der Gesamtmenge bildeten. Die Verbindungen der Gruppe 1 waren mit 9 %, die der Gruppe 3 bzw. 4 mit 4 % und 5 % am Duftstoffprofil beteiligt. Daraus lässt sich ableiten, dass der überwiegende Teil des Substrates in die Produktion der Cadalane fließt. Im Gegensatz dazu stellten die Bildung von **57** bzw. **61** und den makrozyklischen Verbindungen der Gruppe 4 eher Nebenreaktionswege des Enzyms dar.

3.3.2 Stereochemie und Konformationsanalyse der möglichen Bildungswege der Enzymprodukte von MtTPS5

Um den stereochemischen Verlauf der MtTPS5-Katalyse zu untersuchen, wurde die Absolutkonfiguration von 17 Enzymprodukten mittels GC-MS an chiralen stationären Phasen bestimmt (Abb. 13). Da für die beiden Hauptprodukte Cubebol (**64**) und Copan-3-ol (**67**) keine Referenzen zur Verfügung standen, die jeweils beide Enantiomere enthielten, wurden die Verbindungen säurekatalysiert umgelagert. Aus der Stereochemie der entstandenen Kohlenwasserstoffe δ -Cadinen (**65**) und α -Muurolen (**62**) konnte auf die Absolutkonfiguration der Stereozentren der Alkohole zurückgeschlossen werden. Für den quartären Kohlenstoff, der die Hydroxygruppe in Verbindung **67** trägt, war keine Information über die Stereochemie erhältlich.¹⁰⁰ Bei den stereochemischen Analysen stellte sich heraus, dass Germacren D (**34**), *allo*-Aromadendren (**57**), Bicyclogermacren (**61**) und alle analysierten Cadalane ein (*S*)-konfiguriertes Kohlenstoffatom in Position C10 besitzen. Zusätzlich zeigte sich, dass die räumliche Anordnung der anderen Cadalan-Stereozentren an C1, C6 bzw. C7 ebenfalls gleich war. Basierend auf diesen Ergebnissen konnte auf die Absolutkonfiguration der Verbindungen zurückgeschlossen werden, für die keine Referenzen zur Verfügung standen. Desweiteren ergab die Analyse der Enantiomerenüberschüsse, dass alle Verbindungen im Rahmen der Messgenauigkeit optisch rein waren (≥ 98 % *ee*, Abb. 13, Anhang Abb. A-1).

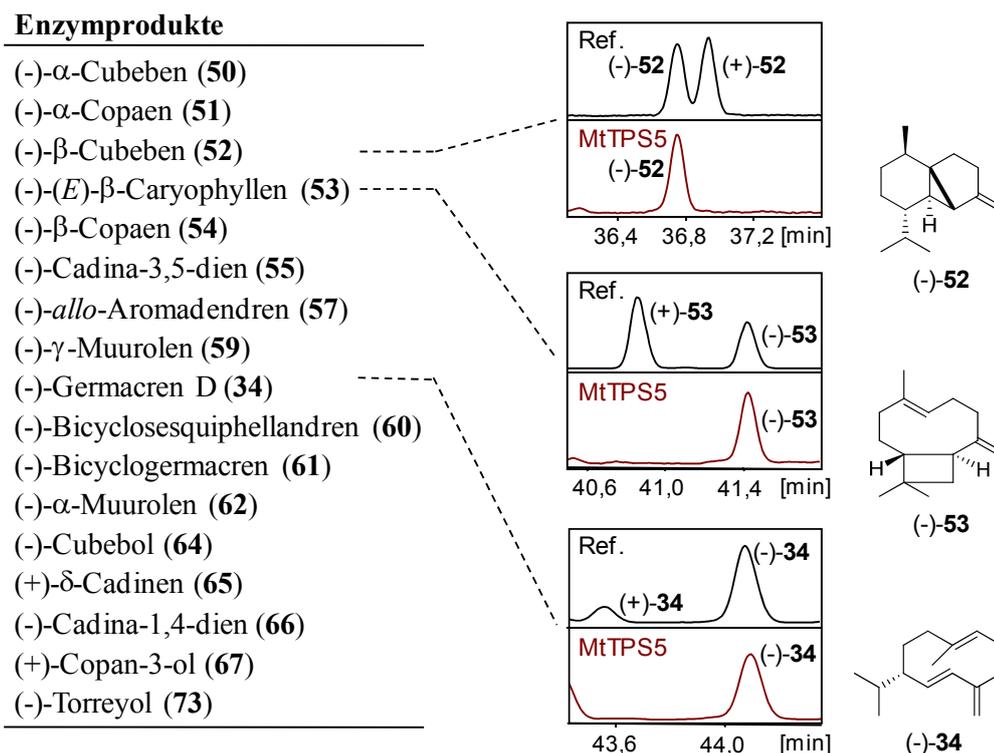


Abb. 13. Die Absolutkonfiguration der Enzymprodukte von MtTSP5. Die stereochemische Analyse Verbindungen wurde mittels GC-MS an chiralen stationären Phasen vorgenommen (für **52**, **53** und **34** gezeigt). Dabei konnten die absoluten Konfigurationen der Stereozentren von 17 Substanzen ermittelt werden (Tabelle). Ref.: Probe die beide Enantiomere enthält.

Die identische Konfiguration der Stereozentren von Verbindungen mit gleichen Kohlenstoff-Grundgerüsten legt nahe, dass diese von gemeinsamen kationischen Intermediaten abstammen, woraus sich durch retrosynthetische Überlegungen die mögliche Startkonformation des Substrates ableiten lässt. Nur eine begrenzte Anzahl von Substratkonformationen erlaubt die Bildung von 10- oder 11-gliedrigen Ringsystemen (Abb. 14).⁶³ Bei vier der möglichen acht diastereomeren Konformationen ist ein elektrophiler Angriff auf die *Si*-Seite der distalen Doppelbindung möglich, der zur Bildung eines (*R*)-konfigurierten Kohlenstoffatoms C10 führt (Abb. 14), das für alle von diesem Intermediat abgeleiteten Verbindungen beobachtet wurde (durch Veränderung der Prioritäten der Substituenten an C10 während der Zyklisierung wird rein formell aus der (*R*)- in den Produkten eine (*S*)-Konfiguration; die räumliche Anordnung bleibt erhalten). Durch die relativen und absoluten Konfigurationen der Brückenkopf-atome von (-)-(*E*)- β -Caryophyllen (**53**) (*2S,10R*), (-)-*allo*-Aromadendren (**57**) (*2R,6S*), den Cadalanen (*cis*-Decalin Ringsystem) und unter Berücksichtigung des „Concept of least motion“¹⁰¹ während der Zyklisierungskaskade, konnte **22a** als Startkonformation für die Bildung der Enzymprodukte identifiziert werden (Abb. 14).

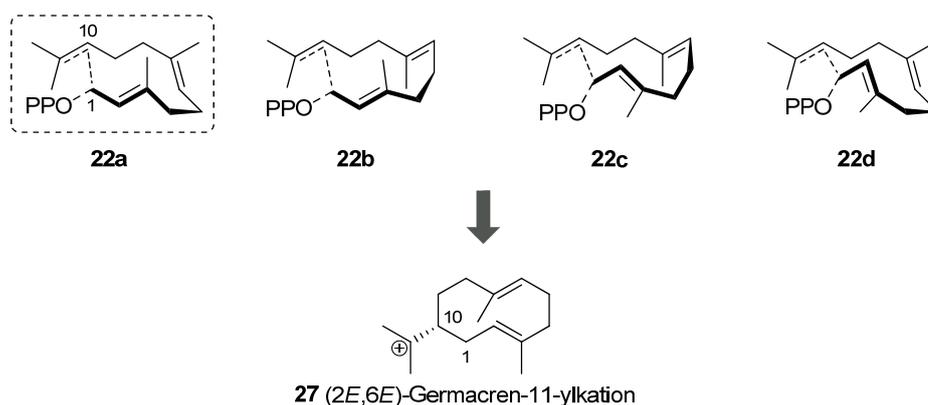


Abb. 14. Mögliche Startkonformationen von (2E,6E)-FDP (22) die nach einer C1-C10-Zyklisierung zu einer (R)-Konfiguration an C10 führen.

3.3.3 Biochemische Charakterisierung

Das Wissen über die biochemischen Eigenschaften von pflanzlichen Terpensynthasen wächst durch viele Studien stetig an. Um die Multiproduktterpensynthase MtTPS5 in die vorliegende Literatur einzuordnen, wurden grundlegende enzymatische Merkmale des Enzyms analysiert. Für das heterolog exprimierte Protein MtTPS5 konnte über Gelfiltration ein Molekulargewicht von 70 kDa ermittelt werden (Abb. 15), was mit dem aus der Aminosäuresequenz errechneten Wert von 66,9 kDa gut übereinstimmt. Da die Messung unter nativen Bedingungen durchgeführt wurde und die vereinigten Eluate (13,6-15,2 ml) Aktivität zeigten, lässt sich schlussfolgern, dass die Terpensynthase zumindest *in vitro* als Monomer vorlag und sich nicht zu größeren Aggregaten zusammenlagerte.

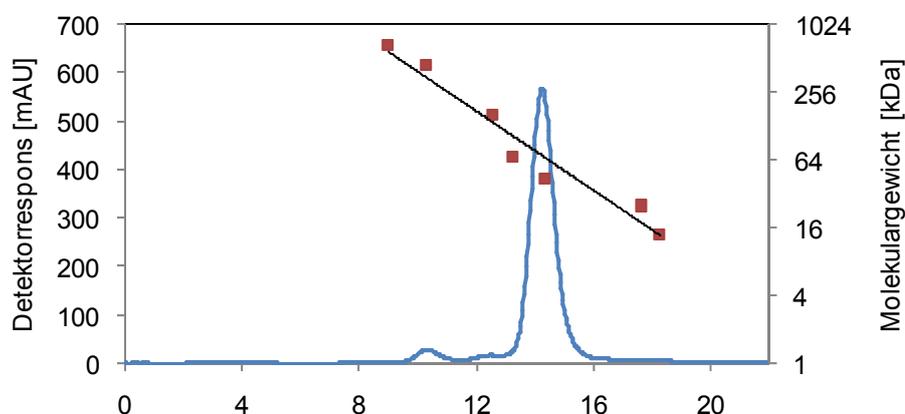


Abb. 15. Bestimmung der molaren Masse von MtTPS5 mittels Gelfiltration. Gezeigt sind die UV-Spur (280 nm) und die durch Vermessung von Proteinen mit bekanntem Molekulargewicht erhaltene Kalibrationsgerade (logarithmische Auftragung).

Die Analyse der Gesamtterpenmenge durch Umsetzung mit radioaktivem $[1-^3\text{H}]$ -(2*E*,6*E*)-FDP bei verschiedenen pH-Werten zeigte, dass MtTPS5 ein sehr breites pH-Optimum (pH = 6,5-8,0) besaß, welches im für Terpensynthasen typischen Bereich um pH = 7,0 lag (Abb. 16). Die Halbwertsbreite der pH-Kurve befand sich bei pH = 6,2 und pH = 9,0. Analoge Umsetzung der Synthese mit nicht markiertem (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) über einen breiten pH-Bereich und die anschließende Analyse der Verbindungen mittels GC-MS offenbarte eine starke Abhängigkeit der Produktspezifität vom pH-Wert. Dabei zeigten die einzelnen Sesquiterpene mit gleichen Kohlenstoffgerüsten einen ähnlichen Verlauf der Produktanteile über den getesteten pH-Bereich. Im Gegensatz dazu waren die Veränderungen zwischen den unterschiedlichen Produktgruppen gegenläufig. Bei pH-Werten unter 5,5 und über 10,5 dominierten die Germacrane. Im zwischenliegenden Bereich stieg das Verhältnis von Germacranen zu Cadalanen von 1:1 auf etwa 1:4 (pH = 8), um dann wieder abzufallen. Die gegenläufigen Veränderungen der Produktanteile von Germacranen und Cadalanen ließ auf einen biosynthetischen Zusammenhang der beiden Produktgruppen schließen.

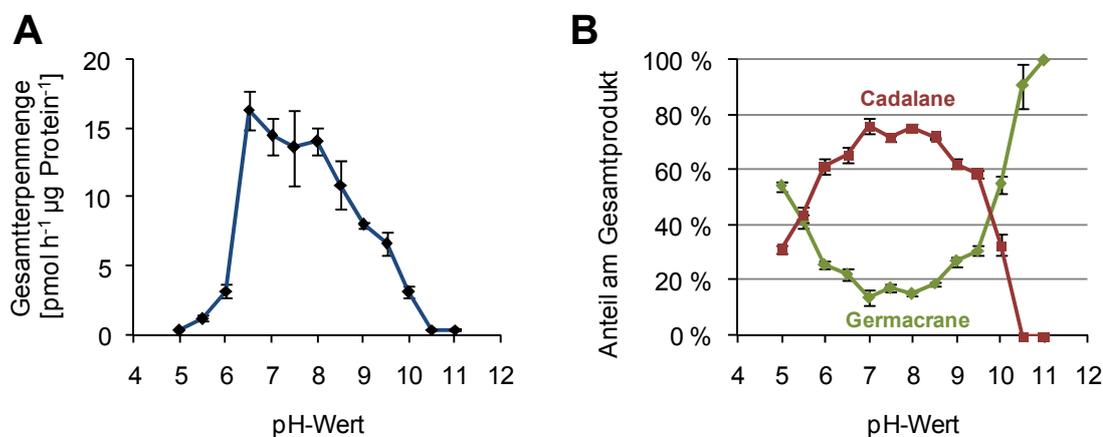


Abb. 16. Die pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität. Das durch Gelfiltration hoch aufgereinigte Protein wurde bei verschiedenen pH-Werten mit (A): $[1-^3\text{H}]$ -(2*E*,6*E*)-FDP inkubiert und die mit Pentan extrahierten Produkte über einen Szintillationszähler quantifiziert bzw. (B): mit unmarkiertem (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) inkubiert und die Produkte per GC-MS analysiert. Dargestellt sind die Summen der prozentualen Anteile der Germacrane (grün) und Cadalane (rot) an der Gesamtproduktmenge.

Da die durch Sesquiterpensynthasen katalysierte Zyklisierung von (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) eine Reaktion 1. Ordnung ist, kann bei der Analyse der kinetischen Daten die Michaelis-Menten-Theorie in ihrer einfachsten Form angewandt werden. Der für **22** bestimmte Wert für die Michaelis-Konstante $K_m = 4,6 \mu\text{M}$ lag im für pflanzliche

Terpensynthesen typischen Bereich. Aufgrund der bekannten molaren Konzentration des hochreinen Proteins konnten zusätzlich die Werte für die katalytische Konstante („turnover number“) $k_{\text{cat}} = 1,50 \cdot 10^2 \text{ s}^{-1}$ und der katalytischen Effizienz $k_{\text{cat}}/K_m = 3,26 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ errechnet werden. Um katalytisch wirksam zu sein, benötigen Sesquiterpensynthesen im Allgemeinen zweiwertige Metallionen als Kofaktoren. Die Analyse der Enzymaktivität in Gegenwart von acht unterschiedlichen divalenten Kationen bei zwei verschiedenen Konzentrationen zeigte, dass nur Magnesium- und Manganionen zu einer nennenswerten Produktion von Terpenen führten (Abb. 17, B). Die Enzymaktivität für beide Ionen war annähernd gleich, wobei die maximale Enzymaktivität für Mangan schon bei geringeren Konzentrationen

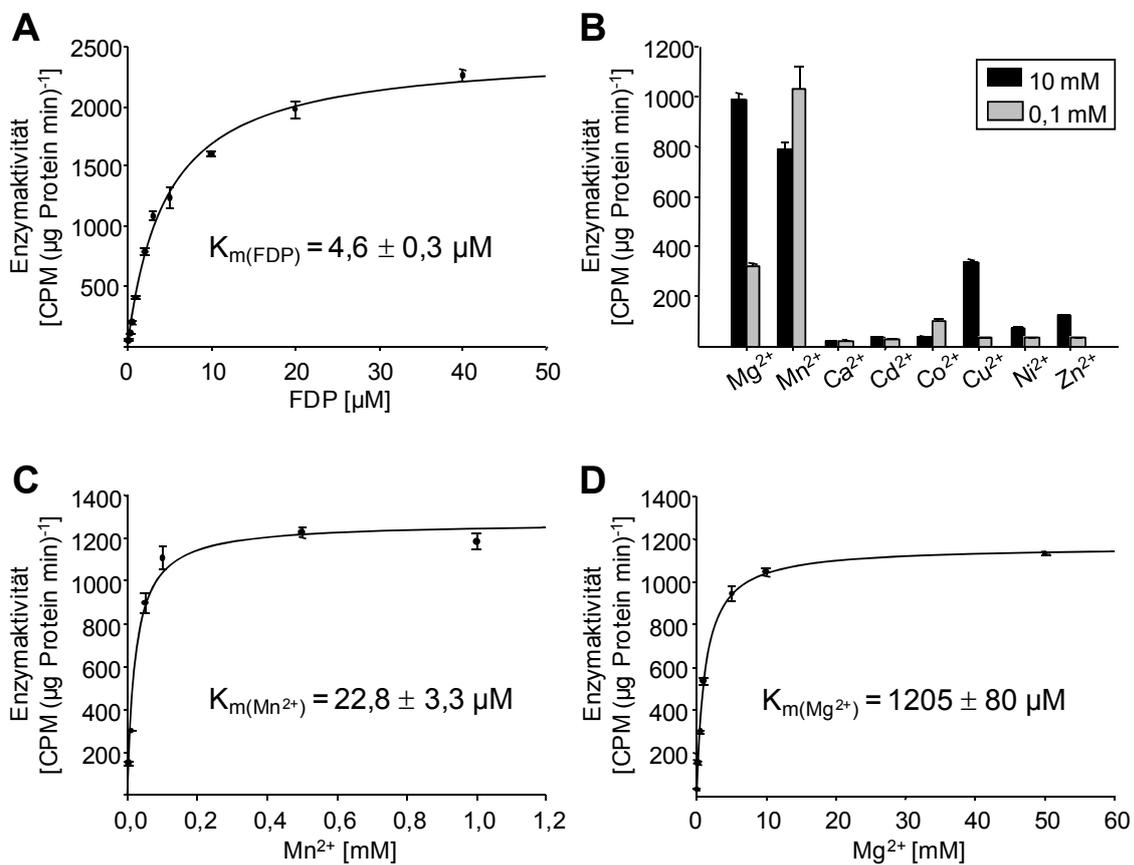


Abb. 17. Bestimmung der K_m -Werte für das Substrat (2E,6E)-FDP (22) (A) und die Kofaktoren Mg^{2+} (C) und Mn^{2+} (D), sowie die Abhängigkeit der Enzymaktivität von verschiedenen zweiwertigen Metallionen (B). Nach Inkubation des hochreinen Proteins MtTPS5 mit $[1\text{-}^3\text{H}]\text{-22}$ wurden die Reaktionsprodukte mit Pentan extrahiert und mittels Szintillationszähler quantifiziert. Die Kalkulation der K_m -Werte erfolgte mit Hilfe des Systat Sigma Plot Enzym Kinetik Tool 1.3.

erreicht wurde. Dies kommt auch durch den für Mangan bestimmten K_m -Wert zum Ausdruck, der etwa um den Faktor 50 niedriger lag als der für Magnesium (Abb. 17, C und D).

Um den Einfluss der Kofaktoren auf die Produktzusammensetzung zu testen, wurde MtTPS5 mit unmarkiertem Substrat umgesetzt, die Produkte mittels GC-FID analysiert und über externe Kalibrationsreihen quantifiziert. Die Wahl des Kofaktors hatte große Auswirkungen auf das Produktverhältnis von Germacränen zu Cadalänen. Während in Gegenwart von Magnesium vorwiegend Cadalane freigesetzt wurden, waren Germacrane die bevorzugten Produkte bei der Mangan-katalysierten Reaktion. Weiterhin begünstigte die Anwesenheit von Manganionen die Bildung von Bicyclogermacren (**61**) und *allo*-Aromadendren (**57**), wohingegen die Anteile von (*E*)- β -Caryophyllen (**53**) und α -Humulen (**56**) an der Gesamtproduktmenge bei beiden divalenten Ionen nahezu konstant blieb (Abb. 18).

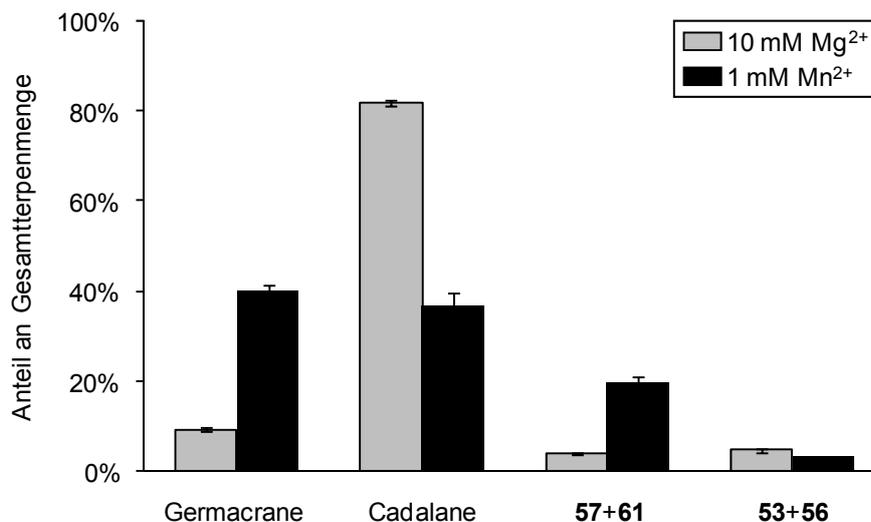


Abb. 18. Einfluss der Kofaktoren auf die Produktspezifität von MtTPS5. Das rekombinante Protein wurde in Gegenwart von Magnesium- oder Manganchlorid mit (*2E,6E*)-FDP (**22**) inkubiert und die mit Pentan extrahierten Produkte mittels GC-FID analysiert. Dargestellt sind die vier strukturell unterschiedlichen Produktgruppen.

3.3.4 Synthese von Substratanaloga

Zur detaillierten Aufklärung der von MtTPS5 katalysierten Reaktionskaskade, wurden verschiedene markierte Substratanaloga synthetisiert. Die Positionen der Deuteriumatome innerhalb der nach Umsetzung mit den markierten Substraten gebildeten Sesquiterpene wurden massenspektrometrisch bestimmt. Neben markierten Verbindungen wurden auch Analoga von potentiellen Reaktionsintermediaten wie (2*Z*,6*E*)-Farnesyldiphosphat (**76**) und verschiedene stereoisomere Nerolidyldiphosphate (**25**) hergestellt.

3.3.4.1 Synthese von deuterierten und stereoisomeren Farnesyldiphosphat-Analoga

Die Strategie zur Synthese von Farnesyldiphosphaten, die an C1 Deuteriumatome tragen, wurde bereits von Cane *et al.* beschrieben.^{102,103} Als Ausgangsverbindungen für das zweifach deuterierte [1,1-²H₂]-(*2E*,6*E*)-Farnesyldiphosphat ([1,1-²H₂]-**22**) dienten Geranylaceton und Triethylphosphonoacetat, die in einer *Wittig*-Reaktion zum entsprechenden Ethylester (**77**) gekuppelt wurden (Abb. 19). Die beiden stereoisomeren Ester (*E*)- und (*Z*)-**77** (4:1) wurden säulenchromatographisch getrennt und anschließend entweder mit Lithiumaluminiumdeuterid oder -hydrid (LiAlD₄, LiAlH₄) zu den entsprechenden Alkoholen [1,1-²H₂]-**78** und **79** reduziert. Die Einführung der Diphosphatgruppe erfolgte über eine Methode von Cramer und Böhm¹⁰⁴, mit einer Optimierung von Keller *et al.*¹⁰⁵ Auf diesem Wege wurde neben zweifach deuteriertem [1,1-²H₂]-**22** auch dessen unmarkiertes Doppelbindungsisomer (*2Z*,6*E*)-FDP (**76**) zugänglich (Abb. 19).

Die Syntheseroute von (*1R*)- und (*1S*)-**22** startete von kommerziell erhältlichem (*2E*,6*E*)-Farnesol (**78**) bzw. von dessen zweifach markiertem Analogon [1,1-²H₂]-**78**, welche mit Hilfe von aktiviertem Mangandioxid zu den entsprechenden Aldehyden **80** und [1-²H]-**80** oxidiert wurden. Die enantioselektive Einführung der Deuterium-Atome wurde durch eine enzymkatalysierte Reduktion mit HLADH (Horse-Liver-Alcohol-Dehydrogenase) erreicht. Bei der Synthese von (*1S*)-**78** wurde ein Hydridion direkt vom Kofaktor NADH auf [1-²H]-**80** übertragen. Im Gegensatz dazu wurde bei der Herstellung von (*1R*)-**78** *in situ* erst das entsprechende NAD²H aus NAD⁺ und [1-²H]-Cyclohexenol (**81**) durch HLADH generiert, bevor die Übertragung des Deuterium-Atoms auf Farnesal (**80**) stattfand (Abb. 20). Ein Vorteil der enzymatisch katalysierten

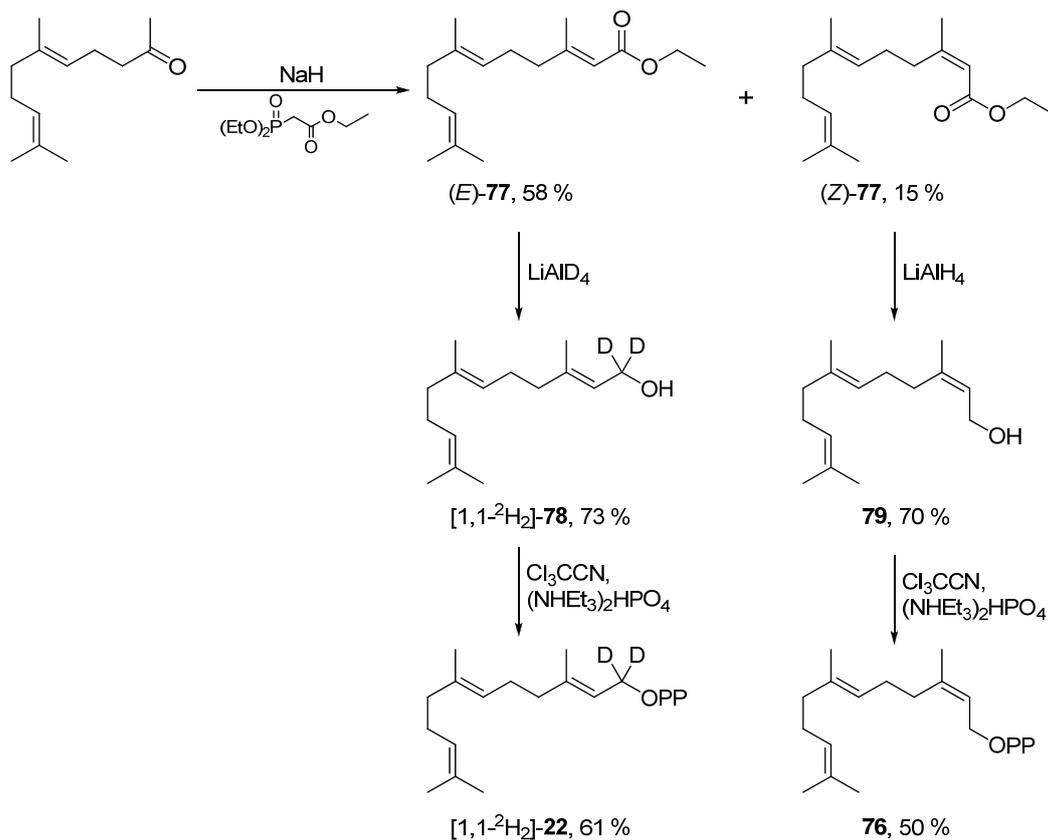


Abb. 19. Synthese von [1,1-²H₂]-(*2E,6E*)-FDP ([1,1-²H₂]-22) und (*2Z,6E*)-FDP (76).

Reaktion liegt in den milden Reaktionsbedingungen, die eine Isomerisierung von (*2E,6E*)-Farnesol (78) zu (*2Z,6E*)-Farnesol (79) ausschließen. Das zusätzlich für die Reaktion benötigte [1-²H]-Cyclohexenol (81) wurde aus kommerziell erhältlichem Cyclohexenon durch Reduktion mit LiAlD₄ dargestellt. Zwar lieferte die Reaktion ein racemisches Produktgemisch von 81, doch können beide Enantiomere von HLADH verwendet werden. Daher konnte 81 in äquimolaren Mengen in der Reaktion eingesetzt werden. Die Einführung der Diphosphatgruppe erfolgte unter den Bedingungen der von Keller modifizierten Cramer-Böhm-Methode.¹⁰⁵ Die Enantiomerenreinheit der chiralen Produkte vor bzw. nach der Phosphorylierung wurde anhand der NMR-Spektren der entsprechenden Mosher-Ester vorgenommen, wobei die Diphosphatgruppe im Falle von (*1R*)- und (*1S*)-22 vorher enzymatisch abgespalten wurde. Die Verwendung von alkalischer Phosphatase verhinderte die Verfälschung des Enantiomerenüberschusses, da die O-P-Bindung gespalten wurde und das stereogene Zentrum unbeeinflusst blieb. Alle Substanzen waren im Rahmen der Messgenauigkeit ($\geq 97\%$ ee) optisch rein. Daraus folgt, dass unter den Bedingungen der Diphosphorylierung keine Racemisierung stattfand.

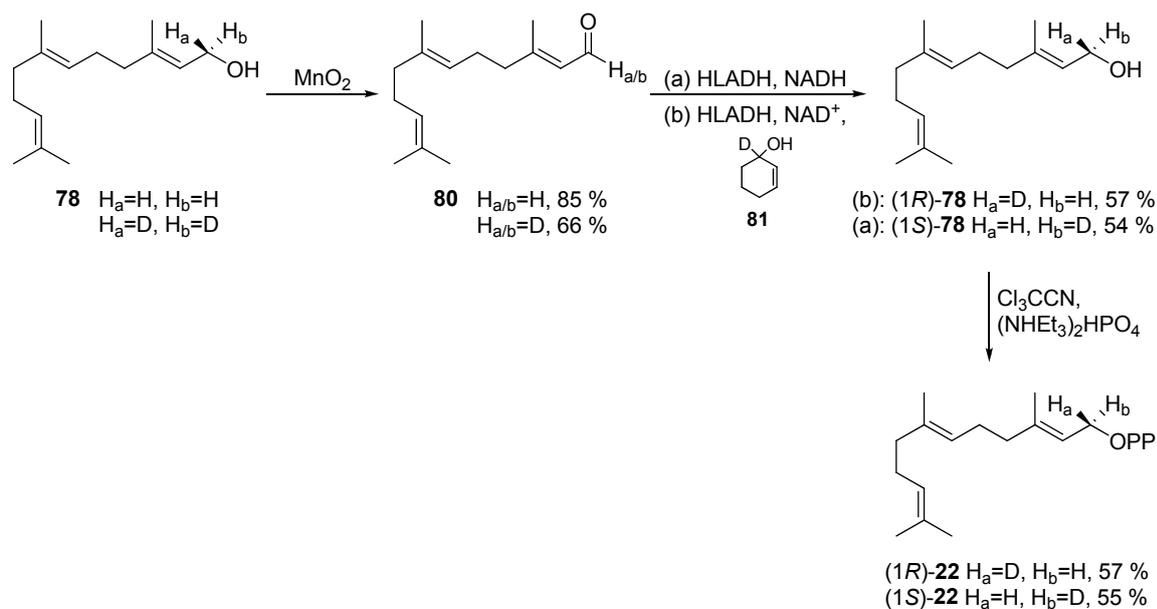


Abb. 20. Synthese von (1S)-[1-²H]-FDP ((1S)-22) und (1R)-[1-²H]-FDP ((1R)-22).

3.3.4.2 Synthese von stereoisomeren Nerolidyldiphosphaten

Die Nerolidyldiphosphate wurden aus den entsprechenden Alkoholen durch Umsetzung mit Di-triethylammonium-orthophosphat und Trichloroacetonitril nach der oben beschriebenen Methode von Cramer und Böhm hergestellt. Die Ausgangsverbindungen waren entweder kommerziell erhältlich ((3S)-48) oder wurden durch frühere Mitglieder der Arbeitsgruppe synthetisiert ([12,12,12,13,13,13-²H₆]-(*3R*)-48)¹⁰⁶ (Abb. 21). Die Enantiomerenüberschüsse der Startsubstanzen und der Endprodukte wurden auf der Stufe der entsprechenden Alkohole mittels GC-MS an chiraler Phase bestimmt (Abb. 21). Dabei zeigte sich, dass es unter den verwendeten Bedingungen für die Bildung der Diphosphate keine Änderung im Enantiomerenverhältnis gab (Abb. 21). Als Referenz für die chiralen Trennungen diente eine racemische Mischung von (*3RS*)-Nerolidol ((*3RS*)-48), die durch eine *Grignard*-Reaktion aus Geranylaceton mit Vinylmagnesiumbromid hergestellt wurde (Abb. 21).

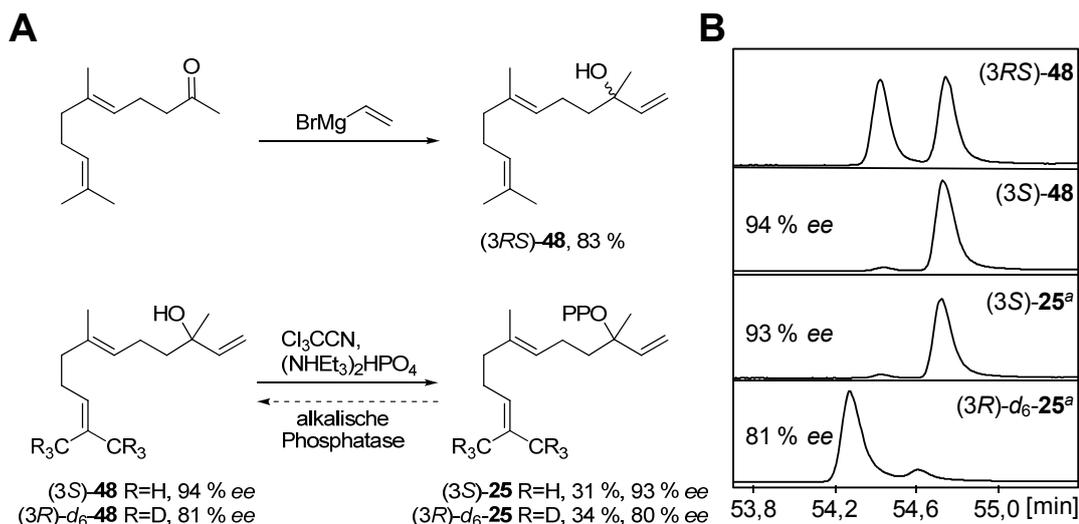


Abb. 21. Synthese von (3RS)-Nerolidol ((3RS)-48), (3S)-NDP ((3S)-25) und (3R)-[12,12,12,13,13,13-²H₆]-NDP ((3R)-d₆-25) (A) und die stereochemische Analyse der Ausgangsstoffe und der Reaktionsprodukte mittels GC-MS unter Verwendung von chiralen Phasen (B). ^aAlkohole freigesetzt durch die Behandlung der angegebenen Diphosphate mit alkalischer Phosphatase.

3.3.5 Hydrid-Shifts und 1,3-Deprotonierungen während der Bildung der MtTPS5 Reaktionsprodukte

Die Schlüsselintermediate der Biosynthese der Cadalane und Germacrane, die den Hauptteil der Enzymprodukte darstellten, sind die beiden doppelbindungsisomeren Germacradien-1-ylkationen **33** und **82**, deren Bildung theoretisch über zwei Wege realisiert werden kann. Eine Verlagerung der positiven Ladung von C11 nach C1 kann entweder durch einen direkten 1,3-Hydrid-Shift (Abb. 22, Weg B) oder durch zwei konsekutive 1,2-Hydrid-Shifts erreicht werden (Abb. 22, Weg A).

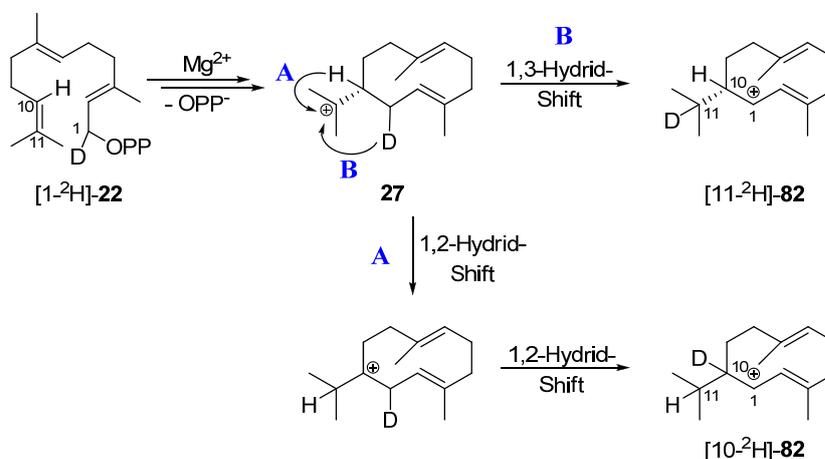


Abb. 22. Mögliche Markierungsmuster des (2E,6E)-Germacren-1-ylkations (**82**) nach der Inkubation von monodeutertem FDP (**22**), aufgrund verschiedener Hydrid-Shifts.

Um zwischen den beiden Wegen zu unterscheiden, wurde MtTPS5 mit FDP-Analoga inkubiert, die an der Position C1 Deuterium tragen ((1*S*)-[1-²H]-FDP, (1*R*)-[1-²H]-FDP und [1,1-²H₂]-FDP). Die massenspektrometrische Analyse der gebildeten Produkte erlaubte die Rekonstruktion der mechanistischen Details der Reaktionskaskade. Die wichtigsten Ionen in den Massenspektren waren das Molekülion, welches direkt die Anzahl der im Molekül verbliebenen Deuterium-Atome widerspiegelte und ein Fragment, das durch den Verlust der Isopropylseitenkette entstand (Abb. 23, Tab. 1).^{70,107,108}

Tab. 1. Massenspektrometrische Molekül- und Fragmentionen von einigen unmarkierten und markierten Produkten, die von MtTPS5 gebildet wurden.

	Ionen (<i>m/z</i>) ^a							
	unmarkiertes (2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-FDP		(1 <i>S</i>)-[1- ² H]- (2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-FDP		(1 <i>R</i>)-[1- ² H]- (2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-FDP		[1,1- ² H ₂]- (2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-FDP	
	M ⁺	a	M ⁺	a	M ⁺	a	M ⁺	a
Germacren D (34)	204	161	205	162	205	161	206	162
Cubebol (64)	204 ^b	161	205 ^b	162	205 ^b	161	206 ^b	162
<i>trans</i> -Cadina-1(6),4- dien (58)	204	161	204	161	205	161	205	161
<i>allo</i> -Aromadendren (57)	204	161	205	162	204	161	205	162
Bicyclogermacren (61)	204	161	205	162	204	161	205	162

^aBildung der Ionen ist in Abb. 23 gezeigt; ^b[M-H₂O]⁺

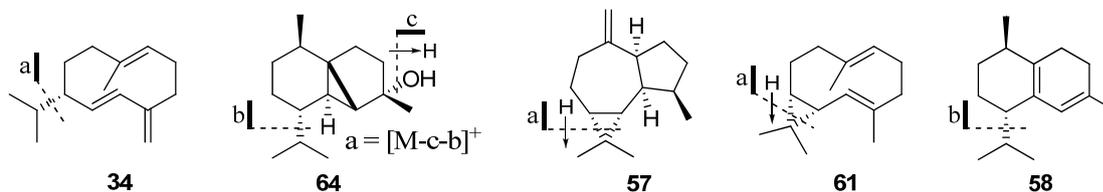


Abb. 23. Bildung wichtiger Fragmentionen einiger MtTPS5-Produkte.

Die Umsetzung des Enzymes mit $[1,1\text{-}^2\text{H}_2]\text{-(}2E,6E\text{)-FDP}$ ($[1,1\text{-}^2\text{H}_2]\text{-22}$) lieferte deuteriertes Germacren D (**34**) und Cubebol (**64**) mit Molekülonen bei $m/z = 206$ (**34**) bzw. $m/z = 224$ (**64**) (Abb. 24). Daraus folgte, dass die zwei Deuteriumatome in den Produkten verblieben waren. Die zusätzlichen Fragmente bei $m/z = 161$, die aus dem Verlust einer markierten Isopropylgruppe ($[\text{M-C}_3\text{H}_6\text{D}]^+$ bzw. $[\text{M-H}_2\text{O-C}_3\text{H}_6\text{D}]^+$) der Masse 44 amu resultierten, zeigten, dass ein Deuteriumatom durch einen direkten 1,3-Hydrid-Shift von Position C1 zu C11 gewandert war. Bei zwei konsekutiven 1,2-Hydrid-Shifts wäre das Deuteriumatom in den Produkten an Position C7 lokalisiert. In diesem Fall wäre ein Fragment mit der Masse $m/z = 162$ entstanden, das aus der Abspaltung einer unmarkierten Isopropylgruppe hervorgegangen wäre. Der stereochemische Verlauf des 1,3-Hydrid-Shifts wurde mit Hilfe der beiden chiral deuterierten Farnesylidiphosphate (*1S*)-**22** und (*1R*)-**22** aufgeklärt. Inkubationen mit (*1R*)-**22** ergaben Germacren D (**34**) und Cubebol (**64**) mit Ionen bei $m/z = 205$ und Fragmentionen bei $m/z = 161$ (Abb. 24). Die Massendifferenz von 44 amu entsprach der Abspaltung einer markierten Isopropylgruppe. Entsprechende Inkubationen der Synthese mit (*1S*)-**22** resultierte in Ionen bei $m/z = 205$ und $m/z = 162$, was die

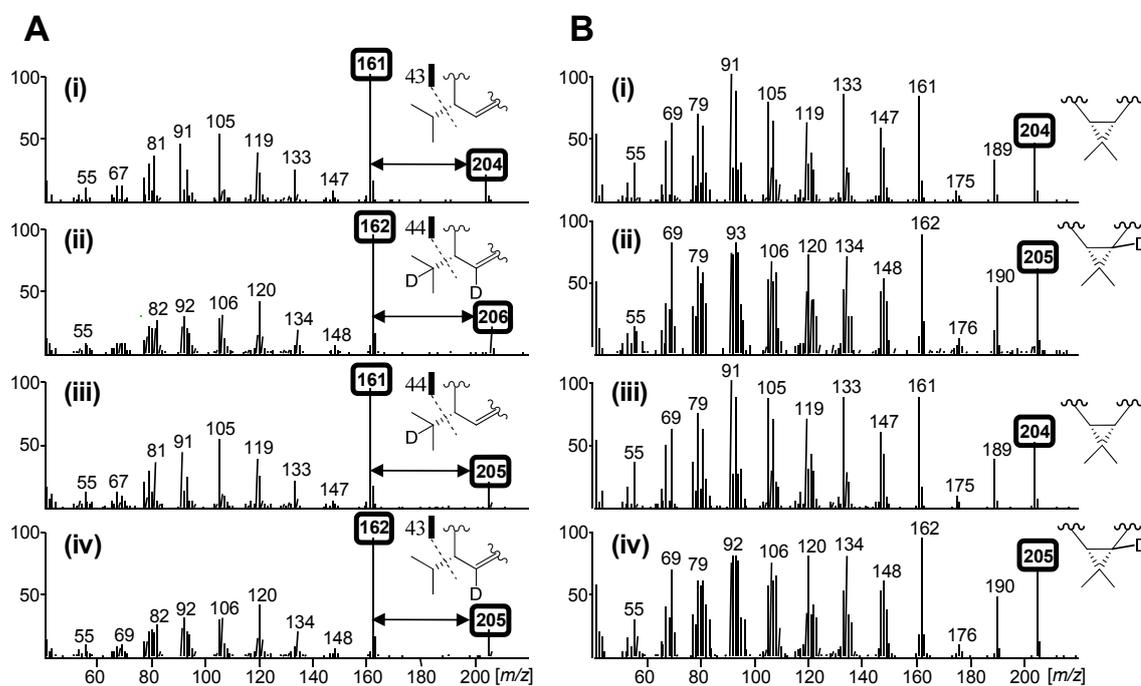


Abb. 24. Massenspektren von Germacren D (**34**) (A) und *allo*-Aromadendren (**57**) (B) nach Inkubation mit deuterierten Farnesylidiphosphaten. (i) unmarkiertes FDP (**22**), (ii) $[1,1\text{-}^2\text{H}_2]\text{-22}$, (iii) (*1R*)- $[1\text{-}^2\text{H}]\text{-22}$, (iv) (*1S*)- $[1\text{-}^2\text{H}]\text{-22}$. Schlüsselionen die zur Aufklärung des stereochemischen Verlaufs der 1,3-Hydrid-Shifts (A) bzw. der 1,3-Deprotonierung (B) dienen, sind hervorgehoben. Die Positionen der Deuteriumatome im Molekül sind ebenfalls gezeigt.

Abspaltung einer unmarkierten Isopropylgruppe und den Verbleib des Deuteriumatoms im Ringsystem bewies (Abb. 24). All diese Ergebnisse entsprechen einem Mechanismus bei dem das C1- H_{Re} des Substrates durch einen suprafacialen 1,3-Hydrid-Shift zum tertiären Kohlenstoffatom der Isopropylgruppe transferiert wird. Die gleichen Resultate wurden für alle Produkte mit einem Germacran- oder Cadalan-Gerüst beobachtet (Tab. 1). Die Analyse der Massenspektren von Bicyclogermacren (**61**) und *allo*-Aromadendren (**57**) (Abb. 24), die durch die gleiche Serie an Inkubationsexperimenten mit deuterierten Farnesyldiphosphaten erzeugt wurden, zeigten den stereospezifischen Verlust des C1- H_{Re} von (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) im Verlauf der Bildung der beiden Substanzen (Abb. 24). Mit (1*R*)-**22** als Substrat wurden für **57** und **61** Massenspektren erhalten, die identisch zu den unmarkierten Verbindungen waren, was den Verlust des Deuteriumatoms belegte. Im Gegensatz dazu verblieb die Markierung nach der Inkubation mit (1*S*)-**22** ($[M]^+$ $m/z = 205$) in den Molekülen (Abb. 24). Der Verlust des gleichen Wasserstoffatoms bei **57** und **61** lässt vermuten, dass die beiden Moleküle in einem biosynthetischen Zusammenhang stehen. Zusammenfassend kann man sagen, dass ausgehend vom (2*E*,6*E*)-Germacren-11-ylkation (**27**) entweder durch einen 1,3-Hydrid-Shift des C1- H_{Re} das (2*E*,6*E*)-Germacren-1-ylkation (**82**) oder durch eine 1,3-Deprotonierung des gleichen Wasserstoffatoms Bicyclogermacren (**61**) gebildet wird, aus dem im weiteren Verlauf *allo*-Aromadendren (**57**) entsteht (Abb. 25).

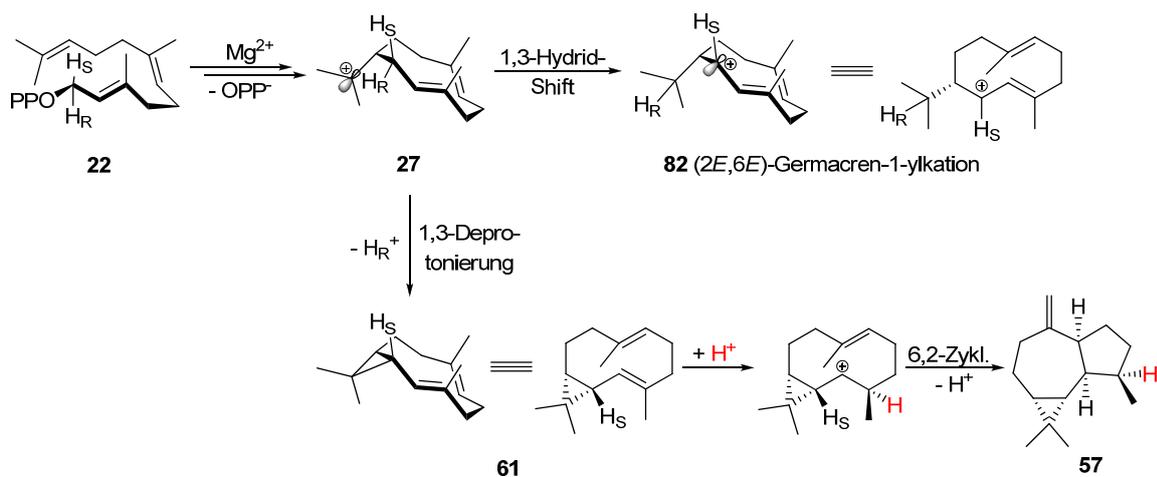


Abb. 25. Stereochemischer Verlauf des 1,3-Hydrid-Shifts und der 1,3-Deprotonierung, die zum (2*E*,6*E*)-Germacren-1-ylkation (**82**) und zu **57** bzw. **61** führen.

Die Massenspektren von *trans*-Cadina-1(6),4-dien (**58**) und Cadina-3,5-dien (**55**) lieferten Informationen über spätere Schritte der Reaktionskaskade. Das Cadinan-7-ylkation (**83**) (Abb. 26) kann über zwei verschiedene Reaktionskanäle in Kation **85** überführt werden, welches der gemeinsame Vorläufer von **55**, **58** und **60** ist. Das entscheidende Experiment, die Inkubation des Enzyms mit (1*S*)-**22**, resultierte in **58**, das ein identisches Massenspektrum wie die unmarkierte Verbindung besaß. Dies kann nur durch zwei konsekutiv ablaufende 1,2-Hydrid-Shifts erklärt werden, wobei zuerst das Deuterium Atom von Position C1 zu C6 verschoben wird (Abb. 26). Bei der anschließenden Doppelbindungsbildung wird ein Deuteron abgespalten und unmarkiertes **58** gebildet. Im Falle eines direkten 1,3-Hydrid-Shifts würde das Deuterid von Position C1 zu C7 wandern und bei der Freisetzung von **58** im Molekül verbleiben (Abb. 26).

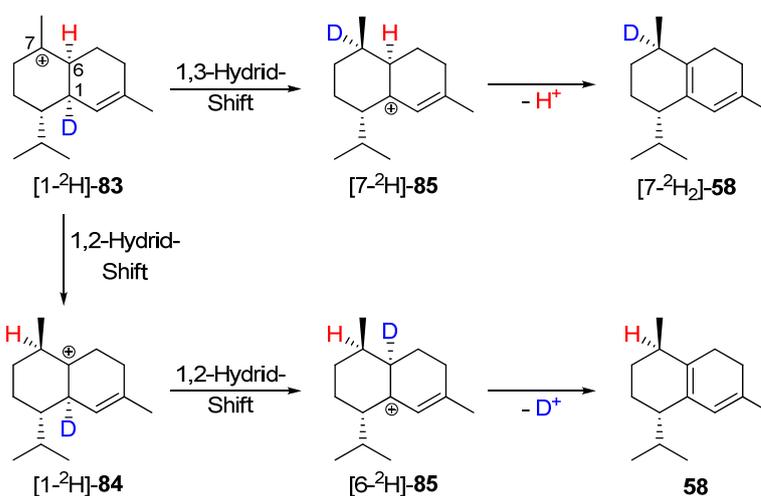


Abb. 26. Mögliche Markierungsmuster von *trans*-Cadina-1(6),4-dien (**58**), die bei der Umsetzung von MtTPS5 mit (1*S*)-[1-²H]-(2*E*,6*E*)-FDP ((1*S*)-**22**) durch verschiedene Hydrid-Shifts zu erwarten sind.

3.3.6 Protonentransferreaktionen bei der Bildung von Cadalanen und *allo*-Aromadendren (**57**)

Um die Existenz von Protonenübertragungen auf neutrale Intermediate in der Reaktionskaskade zu überprüfen, wurde die Enzymaktivität in Gegenwart von Deuteriumoxid (D₂O) analysiert. Dazu wurde dem Puffer, in dem die Synthese gelöst war, das Wasser durch Gefriertrocknung entzogen, der Rückstand in D₂O aufgenommen und mit (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) umgesetzt. Durch die massenspektrometrische Analyse konnte gezeigt werden, dass die Produkte in unterschiedlichem Maße Deuterium

aufnahmen. Die Germacrane (**34**, **68** und **74**), (*E*)- β -Caryophyllen (**53**), α -Humulen (**56**) und Bicyclogermacren (**61**) zeigten keinen Einbau von Deuterium (Anhang, Tab. A-4). Dies steht im Einklang mit den in der Literatur beschriebenen Bildungsmechanismen dieser Verbindungen.^{63,109} Im Gegensatz dazu war das Molekölion von *allo*-Aromadendren (**57**), bedingt durch die Aufnahme von einem Deuteriumatom, um 1 amu auf $m/z = 205$ erhöht. Mit großer Wahrscheinlichkeit wird das Proton auf das enzymgebundene neutrale Intermediat **61** an Position C3 übertagen, wodurch die C1-C5-Zyklisierung initiiert wird. Diese Ergebnisse untermauern eine Hypothese die im Rahmen der Untersuchungen der Kelsoen- und Prespatan-Biosynthese postuliert wurde, wonach das (-)-*allo*-Aromadendrenylkation, der direkte Vorläufer von **57**, über eine Deprotonierung-Reprotonierungskaskade gebildet wird.¹¹⁰ Die exakte Position des Deuteriums konnte aufgrund von Wasserstoff-Scramblings während des

Tab. 2. Deuteriumgehalt ausgewählter Produkte, die durch Inkubation in D₂O erhalten wurden. Zusätzlich sind kinetische Isotopeneffekte der Verbindungen mit exozyklischer C3-C15-Doppelbindung angegeben. Mittelwerte und Standardabweichungen sind Resultate vier unabhängiger Experimente. (Zu Mutante Y526F siehe Abschnitt 3.3.7)

	Deuteriumgehalt (%-d ₁)		Isotopeneffekte
	Wildtyp	Mutante Y526F	k _H /k _D ^b
α -Cubeben (50)	92 ± 1	29 ± 4	
β -Cubeben (52)	74 ± 1	24 ± 3	2,14 ± 0,18
α -Copaen (51)	92 ± 1	30 ± 6	
β -Copaen (54)	60 ± 3	11 ± 3	0,97 ± 0,10
Bicyclosesquiphellandren (60)	73 ± 5	n. d.	2,26 ± 0,30
γ -Muurolen (59)	91 ± 1	2 ± 5	
δ -Amorphen (63) ^a	-4 ± 0	-1 ± 1	
<i>allo</i> -Aromadendren (57)	98 ± 0	64 ± 4	
Bicyclogermacren (61) ^a	11 ± 10	0 ± 1	

^aNegative Werte oder hohe Standardabweichungen sind eine Konsequenz von niedrigen Produktkonzentrationen (< 0,5 %), die einen erhöhten Einfluss des Hintergrundes auf die berechneten Werte bedingen.

^bKorrekturen für Produktionenmengen die von unvollständiger Deuterierung herrühren, basieren auf der Annahme, dass **50**, **51**, **52**, **54**, **59** und **60** vom gleichen kationischen Intermediat abstammen. Daraus folgt, dass **52**, **54** und **60** die gleichen Deuteriumgehalte wie Substanzen ohne exozyklische Doppelbindung besitzen sollten (92 %-d₁).

Fragmentierungsprozesses im Massenspektrometer (vgl. Schmidt *et al.*¹⁰⁷) nicht bestimmt werden. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung des Enzymproduktgemisches war es nicht möglich, eine Probe von **57** in ausreichend hoher Reinheit herzustellen, die eine Analyse mittels NMR erlaubt hätte.

Überraschenderweise wurden bei allen Cadalanen außer δ -Amorphen (**63**) und T-Cadinol (**71**), Markierungsgrade von bis zu 92 %-d₁ beobachtet (Tab. 2, Anhang Tab. A-4). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Hypothese von Arigoni, dass die Bildung von Cadalan-artigen Sesquiterpenen durch den Transfer eines Protons auf die exozyklische Doppelbindung von *transoidem* Germacren D (**34**) initiiert werden kann.⁶⁹ Einen Rückschluss auf den genauen Ort der Deuteronenübertragung ließen die verringerten Isotopeneinbauraten von β -Cubeben (**52**) (74 %-d₁), β -Copaen (**54**) (60 %-d₁) und Bicyclosesquiphellandren (**60**) (73 %-d₁) zu. Das gemeinsame strukturelle Merkmal der drei Verbindungen war eine exozyklische Doppelbindung zwischen C3 und C15, die im letzten Schritt unter Verlust eines Protons des entsprechenden Kations gebildet wurden. Durch den Transfer des Deuterons auf das Kohlenstoff C15 von **34** unter Ausbildung einer CH₂D-Methylgruppe, lassen sich die geringeren Markierungsgrade von **52**, **54** und **60** erklären (Abb. 27).

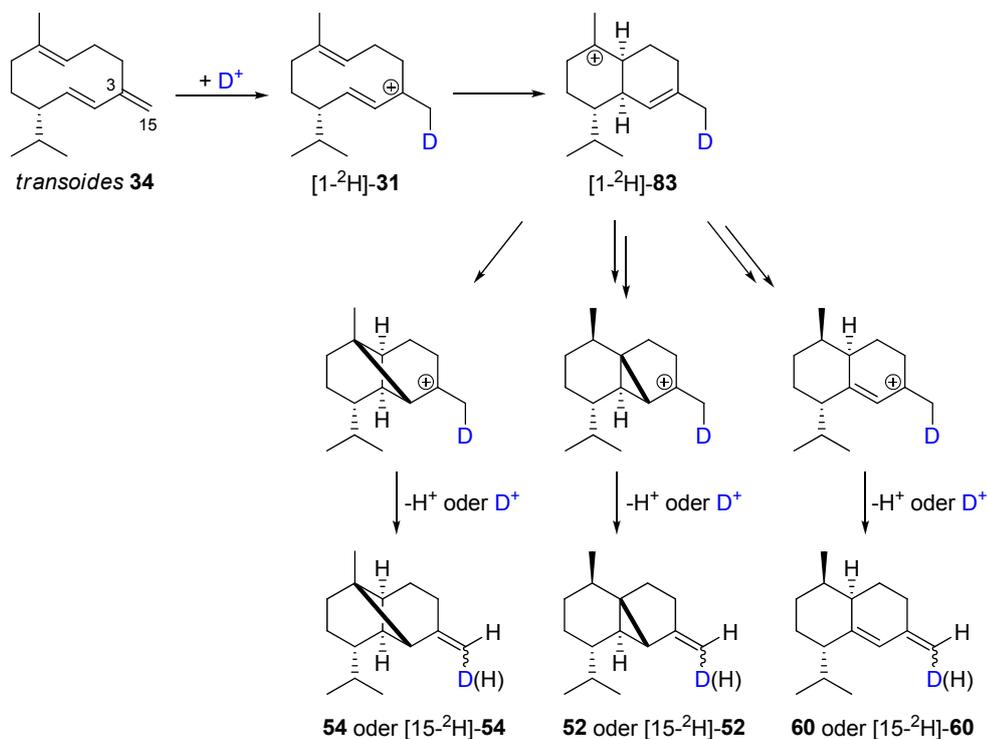


Abb. 27. Mögliche Markierungsmuster der Produkte mit einer exozyklischen Doppelbindung (**52**, **54**, **60**) nach der Inkubation von MtTPS5 mit (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) in D₂O.

Um intramolekulare kinetische Isotopeneffekte bei den Methyl-Methylen-Eliminierungsreaktionen zu bestimmen, mussten die Deuterierungsgrade im Hinblick auf die unvollständige Markierung der anderen Cadalane (92 %-d₁) korrigiert werden. Dies geschah unter Annahme, dass die α - und β -Isomere von Cubeben (**50**, **52**) und Copaen (**51**, **54**) sowie Bicyclossequiphellandren (**60**) und *trans*-Cadina-1(6),4-dien (**58**) vom gleichen kationischen Intermediat abstammten. Die unter Berücksichtigung dieser Annahme berechneten primären intramolekularen Isotopeneffekte für **52** und **60** ($k_H/k_D = 2,1-2,3$; Tab. 2) lagen am unteren Ende der für CH₃→CH₂-Eliminierungen berichteten Werte von Terpenzyklasen ($k_H/k_D = 2,1-5,9$).^{45,111,112} Im Gegensatz dazu war bei der Bildung von **54** die Spaltung der C-H- bzw. C-D-Bindung nicht am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beteiligt ($k_H/k_D = 1,0$).

3.3.7 Identifizierung von Tyrosin 526 als Schlüsselaminosäure für den Protonierungsmechanismus

Die 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS) aus Tabak katalysiert eine zu MtTPS5 ähnliche Reaktion: die Umsetzung von Farnesyldiphosphat zu 5-*epi*-Aristolochen (**37**).¹¹³ Diese Reaktion verläuft über das enzymgebundene stabile Intermediat Germacren A (**36**), das durch Protonierung und anschließende 2,7-Zyklisierung ein Carbokation mit Eudesmangrundgerüst liefert (Abb. 28). Die folgende 2,3-Hydridverschiebung, eine Wagner-Meerwein-Umlagerung und eine Deprotonierung führen schließlich zum 5-*epi*-Aristolochen (**37**). Mutagenesestudien bekräftigten die von Starks *et al.* veröffentlichte Hypothese, dass eine katalytische Triade aus einer Tyrosin- sowie zwei Aspartatseitenketten (Tyr520, Asp444, Asp525) als Protonendonator fungiert.^{83,84} Das Fehlen der Hydroxygruppe in der Mutante Y520F (TEAS) führte zu einem Enzym, das fast ausschließlich Germacren A (**36**) bildete (Abb. 28).⁸⁴

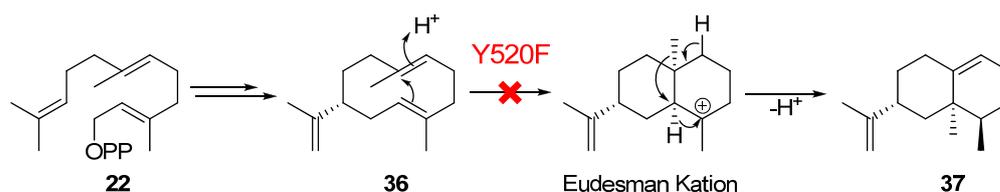


Abb. 28. Mechanismus der Bildung von 5-*epi*-Aristolochen (37**) aus (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) über das neutrale Intermediat Germacren A (**36**).** Durch Austausch der Tyrosinseitenkette mit Phenylalanin (Y520F) stoppt die Reaktion auf der Stufe von **36**.

MtTPS5	1	MSTVAYS [■] DHDAKQ-RNLADYHPSVWGGFFLQYASETMELDQNLASQIDTLKDEV [■] RNMLVS
TEAS	1	MASAAVANYEEEI [■] VRPVADFS [■] PSLWGDQFLSFSIDN-QVAEKYAKEIEALKEQ [■] TRNMLLA
MtTPS5	60	KTEMPLTKVKLIDSICRLGVGYHFEKEIDEVLQ [■] HIHKS [■] YVENGEITLED [■] SLC [■] SLAM [■] LFRV
TEAS	60	TGMKLADTLN [■] LIDTIER [■] LGIS [■] YHFEKEIDDIL [■] DQIYNQNSNCN-----DL [■] CTSALQ [■] FRL
MtTPS5	120	FRQ [■] QGLHVS [■] PNVFN [■] KFK [■] DKQ [■] GNFNENLST [■] DVEG [■] MLSL [■] YEASH [■] MMV [■] HEDDILEEAL [■] NFTST
TEAS	114	LRQ [■] HGFNIS [■] PEIF [■] SKF [■] QDENGK [■] FKES [■] LAS [■] DVL [■] GLLN [■] LYEASH [■] V [■] RTHAD [■] DILEDAL [■] AFSTI
MtTPS5	180	HLESIASQSSPSLAAQIEY [■] TLKQAL [■] HKNI [■] PRLEAR [■] H [■] YIS-IVE [■] KDPT [■] CDEV [■] LLT [■] FAK [■] LDF
TEAS	174	HLESAAPHLKSP [■] LREQ [■] VTHALE [■] QCL [■] HKG [■] VPRV [■] ETRF [■] FISS [■] IYD [■] KEQS [■] KNN [■] VLL [■] RFA [■] LDF
MtTPS5	239	<div style="text-align: center;">RXX₈W</div> NLLQSLH [■] QKE [■] FGN [■] ISK [■] W [■] KE [■] LDFST [■] KL [■] PYARD [■] RIA [■] ECS [■] FW [■] VLTA [■] FFEPQ [■] YSQ [■] ARK [■] MM [■] IKV
TEAS	234	NLLQMLH [■] KQELA [■] QVSR [■] W [■] WKD [■] LDFV [■] TTL [■] PYARD [■] RV [■] VECY [■] FWAL [■] GVY [■] FEPQ [■] YSQ [■] AR [■] VML [■] VKT <div style="text-align: center;">* *</div>
MtTPS5	299	<div style="text-align: center;">DDXXD</div> ITLLSII [■] DDTY [■] DAYGT [■] ID [■] ELE [■] LF [■] TKA [■] VER [■] WDI [■] SS [■] LDEL [■] PDY [■] MK [■] PI [■] YRS [■] FL [■] TI [■] VEE [■] IE [■] KEM
TEAS	294	ISMISIV [■] DDTF [■] DAYGT [■] VKE [■] LEAY [■] TD [■] AIQR [■] WDINE [■] ID [■] RL [■] PDY [■] MK [■] IS [■] VK [■] AIL [■] DL [■] V [■] KDY [■] EKEL <div style="text-align: center;">* * *</div>
MtTPS5	359	RKEGR [■] IY [■] TL [■] DY [■] KIE [■] FK [■] SV [■] QAF [■] MT [■] EAR [■] WLN [■] EN [■] HI [■] PTTE [■] EY [■] MR [■] ISK [■] KS [■] GA [■] YPL [■] LIL [■] TSY [■] I
TEAS	354	SSAGR [■] SH [■] IV [■] CHA [■] IERM [■] K [■] EV [■] VR [■] NY [■] NV [■] EST [■] W [■] FI [■] EG [■] YT [■] PP [■] VSE [■] YLS [■] NAL [■] ATTT [■] YY [■] YL [■] AT [■] TSY [■] L <div style="text-align: center;">* **</div>
MtTPS5	419	<div style="text-align: center;">NSE/DTE</div> GMGDIATKEIF [■] NW [■] VS [■] NE [■] PRIV [■] NAAAT [■] LCRL [■] MD [■] EIV [■] SS [■] E [■] FE [■] Q [■] KR [■] GH [■] VCS [■] LLD [■] CY [■] MK [■] Q [■] F [■] DMS
TEAS	414	GM-KSATEQDFEW [■] LS [■] KN [■] PK [■] ILEAS [■] VII [■] CR [■] VID [■] TAT [■] Y [■] E [■] VE [■] K [■] SR [■] GQ [■] IAT [■] GIE [■] CC [■] MR [■] DY [■] GIS <div style="text-align: center;">* * * *</div>
MtTPS5	479	<div style="text-align: center;">526 530</div> REAAIQECKNRMTIV [■] WKD [■] INEE [■] CL [■] RPTE [■] V [■] PMP [■] FM [■] TR [■] VLN [■] LS [■] RF [■] MD [■] V [■] YK-N [■] K [■] D [■] NY [■] TD [■] SDG
TEAS	473	TKEAMAKFQ [■] NMA [■] ETA [■] WKD [■] INEGL [■] LR [■] PT [■] V [■] ST [■] EFL [■] TP [■] IL [■] NL [■] ARI [■] VE [■] V [■] Y [■] HN [■] LD [■] GY [■] TH [■] PEK <div style="text-align: center;">* * *</div>
MtTPS5	538	LMK [■] TCI [■] KEV [■] L [■] VD [■] P [■] V [■] PI
TEAS	533	VLK [■] PH [■] I [■] N [■] L [■] LV [■] D [■] S [■] I [■] K [■] I

Abb. 29. Vergleich der Aminosäuresequenzen von MtTPS5 und der 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS) aus Tabak. Schwarz hinterlegte Aminosäuren sind identisch, grau hinterlegte ähnlich. Die hochkonservierten an der Metallionenbindung beteiligten „DDXXD“- und „RXX“- und „NSE/DTE“-Motive sind gekennzeichnet. Sternchen (*) markieren die Aminosäuren, die am Aufbau des aktiven Zentrums von TEAS beteiligt sind.⁸³ Rot hervorgehoben sind die zu der katalytischen Triade aus TEAS korrespondierenden Aminosäuren.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen von MtTPS5 und TEAS zeigte, dass in MtTPS5 die am Aufbau der katalytischen Triade beteiligten zwei Aspartatreste (MtTPS5 D450, D530) und der Tyrosinrest (MtTPS5 Y526) konserviert waren (Abb. 29). Mit Hilfe von Mutageneseexperimenten wurde untersucht, ob und wie sich der Austausch von Tyrosin durch Phenylalanin in Position 526 auf die Produktbildung von MtTPS5 auswirkt. Die durch *in vitro*-Mutagenese (durchgeführt von T. Köllner, Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena) hergestellte und in *E. coli* heterolog exprimierte Mutante Y526F zeigte neben einer deutlich reduzierten Gesamtzymaktivität, die nur noch etwa 10 % der des Wildtypen entsprach, ebenfalls eine starke Veränderung der Produktspezifität (Abb. 30). Die Entfernung der phenolischen OH-Gruppe resultierte in der Bildung von Sesquiterpenen mit vorwiegend Germacran-Grundgerüst, namentlich Germacren D (34), 4 α -Hydroxygermacra-1(10),5-

dien (**68**) und Bicyclogermacren (**61**), die etwa 75 % des Produktgemisches ergaben. Im Gegensatz dazu war die Produktion von Cadalan-Sesquiterpenen (15 %) im Vergleich zum Wildtyp (82 %) stark unterdrückt. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Tyrosinseitenkette (Y526) eine wichtige Funktion bei der Protonierung von Germacren D (**34**) innehat.

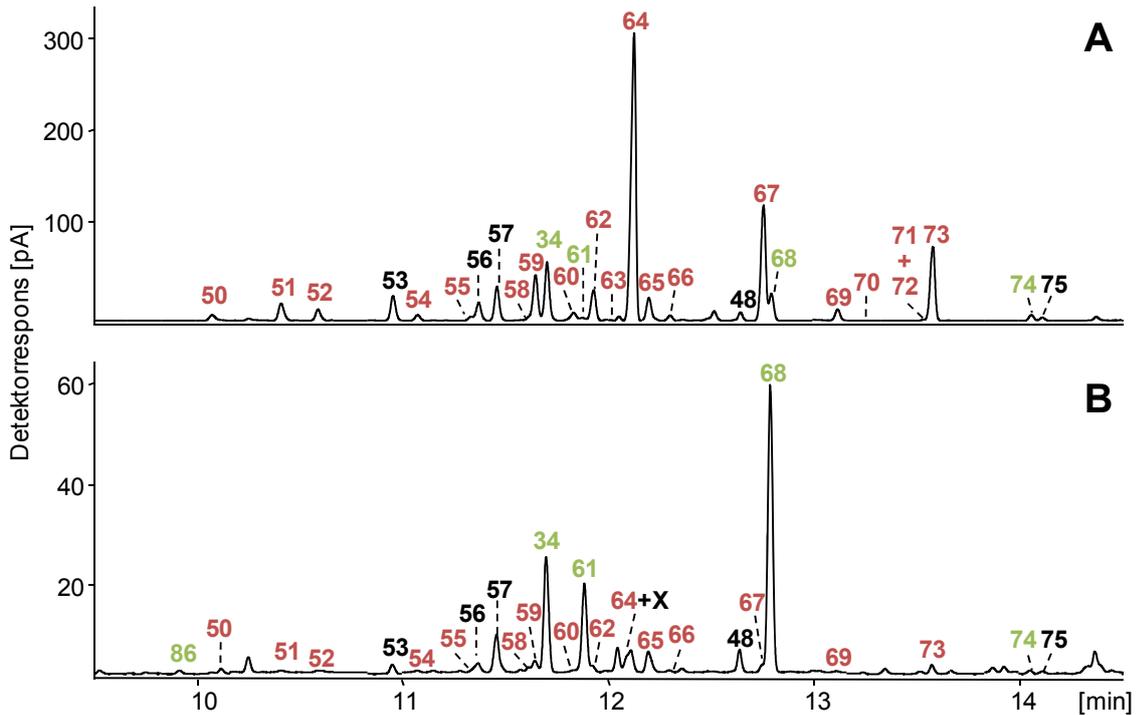


Abb. 30. GC-FID Chromatogramm der Sesquiterpenprodukte von MtTPS5 Wildtyp (A) und der Y526F-Mutante (B) nach Inkubation mit (2*E*,6*E*)-FDP (**22**). Die Verbindungen wurden anhand ihrer Retentionsindizes und der Massenspektren im Vergleich zu authentischen Referenzen identifiziert. Die Nummerierung entspricht der aus Abb. 12. Zusätzlich konnte Bicycloelemen (**86**), ein thermisches Umlagerungsprodukt von **61** identifiziert werden. Germacran-Sesquiterpene sind grün und Cadalan-Sesquiterpene rot gekennzeichnet. X: BHT-ähnliche Verunreinigung.

Um den Bildungsweg der Cadalan-Sesquiterpene in der Y526F Mutante zu klären, wurden Inkubationsexperimente in D₂O (vgl. Abschnitt 3.3.6) durchgeführt. Die geringen Einbauraten von Deuterium (0-30 %-d₁) in die von der Mutante produzierten Cadalane weisen auf einen anderen Reaktionskanal für deren Bildung im Vergleich zum Wildtyp hin. Die plausibelste Alternative ist ein allgemein hin akzeptierter Reaktionsweg, der über das Intermediat Nerolidyldiphosphat (NDP, **25**) als Intermediat verläuft (siehe Abschnitt 3.3.8). Der Einfluss der Mutation auf die Protonierung im Bezug auf die Biosynthese von *allo*-Aromadendren (**57**) ist komplexer. Einerseits

konnte eine deutliche Akkumulation des neutralen Intermediates Bicyclogermacren (**61**) beobachtet werden (0,3 % WT; 12,9 % Y526F Mutante), andererseits konnte eine um ca. 70 % erhöhte Freisetzung von **57** im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (3,5 % WT; 5,9 % Y526F Mutante). Zusätzliche Markierungsexperimente der Y526F Mutante in D₂O lieferten **57**, das einen im Vergleich zum Wildtypen reduzierten Deuteriumgehalt (WT: 98 %-d₁; Y526F Mutante: 64 %-d₁) aufwies. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass andere Aminosäureseitenketten, als die des Tyr526, eine wichtige Rolle bei der Übertragung eines Protons auf Bicyclogermacren (**61**) spielen.

3.3.8 Frühe Stufen in der Produktbildung der Cadalane

Die unter Abschnitt 3.3.6 und 3.3.7 beschriebenen Experimente zeigten, dass der Reaktionsweg zu den Cadalan-Sesquiterpenen hauptsächlich über die Protonierung von Germacren D (**34**) verläuft. Markierungsexperimente mit der Y526F-Mutant deuteten darauf hin, dass aber auch noch ein zweiter protonenunabhängiger Reaktionsweg von MtTPS5 für die Bildung von Cadalan-Sesquiterpenen genutzt wird, der über die Zwischenstufe Nerolidyldiphosphat (**25**) verläuft. Die Isomerisierung des anfänglich gebildeten (*2E,6E*)- zum (*2Z,6E*)-Farnesylykation (**24**, **26**) wird dabei über die Drehung der C2-C3-Einfachbindung des tertiären allylischen Intermediates **25** realisiert. Um zu überprüfen, ob Nerolidyldiphosphat für die MtTPS5 ein potentiell Intermediat der Cadalan-Biosynthese darstellte, wurde die Enzymaktivität in Gegenwart von **25** und (*2Z,6E*)-FDP (**76**), dem artifiziellen Substratanalogon zu **26**, analysiert.

3.3.8.1 Inkubationen mit enantiomeren Nerolidyldiphosphaten (NDP)

Das Produktspektrum von MtTPS5 nach Umsetzung mit (*3S*)-NDP ((*3S*)-**25**) wurde von (*E*)- β -Farnesen (**87**) (88,5 %) dominiert (Abb. 31). Weiterhin wurden zwei weitere azyklische Nebenprodukte, (*E,E*)- α -Farnesen (**88**) (4,4 %) und (*3S*)-Nerolidol ((*3S*)-**48**) (7,1 %), über ihre Massenspektren und Retentionsindizes identifiziert. Daraus folgte, dass MtTPS5 nicht in der Lage war, (*3S*)-**25** zu zyklischen Verbindungen umzusetzen. Vielmehr wurde das nach der Abspaltung der Diphosphatgruppe gebildete Farnesylykation durch Deprotonierung in die doppelbindungsisomeren Farnesene **87** und **88** überführt (Abb. 32). Bei Inkubation der Synthase mit (*3R*)-d₆-NDP ((*3R*)-d₆-**25**)

entstanden ebenfalls hauptsächlich die beiden Farnesene **87** (29,5 %) und **88** (13,5 %). Im Gegensatz zu den Umsetzungen mit (3*S*)-**25** konnte auch ein Großteil der Produkte nachgewiesen werden, deren Bildung sonst nur in der Gegenwart von (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) beobachtet wurde (Abb. 31).

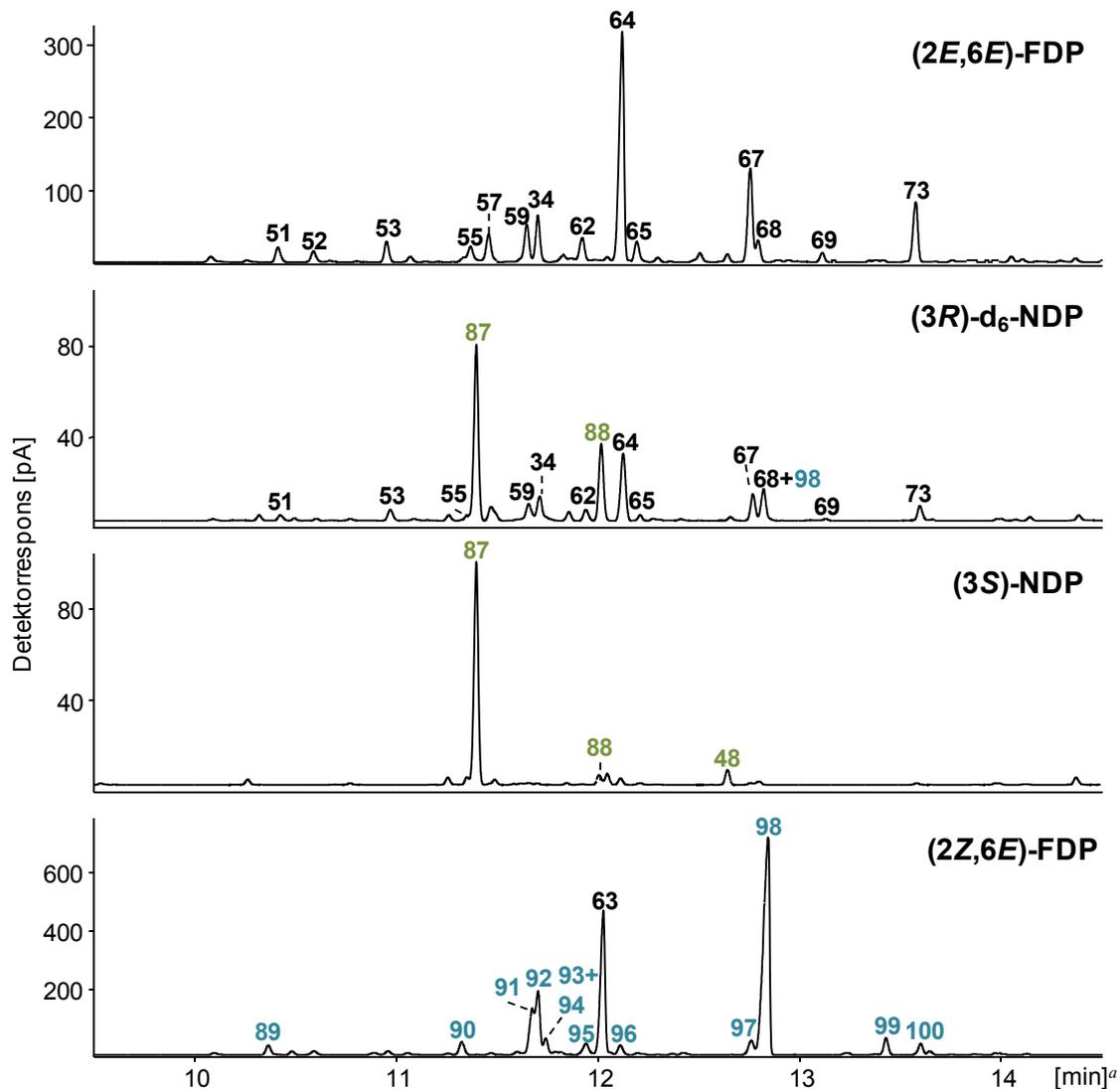


Abb. 31. GC-FID Chromatogramme der Sesquiterpenprodukte, die nach Inkubation des MtTPS5-Wildtyps mit (2*E*,6*E*)-FDP (**22**), (3*S*)-NDP ((3*S*)-**25**) bzw. (3*R*)-d₆-NDP ((3*R*)-d₆-**25**) und (2*Z*,6*E*)-FDP detektiert wurden. Produkte die mehr als 1 % zum Gesamtprofil beitragen, sind nach Abb. 12 nummeriert. Zusätzlich konnten **87** (*E*)- β -Farnesen, **88** (*E,E*)- α -Farnesen, **89** α -Ylangen, **90** α -Himachalen, **91** Isobicyclogermacren, **92** α -Amorphen, **93** γ -Humulen, **94** γ -Himachalen, **95** β -Himachalen, **98** Humulan-4,9-dien-8-ol und **100** 2-Himachalen-7-ol aufgrund ihrer Retentionsindizes und Massenspektren identifiziert werden. Bei den Verbindungen **96**, **97** und **99** (C₁₅H₂₆O II-IV) handelt es sich um Sesquiterpenalkohole unbekannter Struktur. Die nur bei den Inkubationen mit NDP (**25**) detektierten Produkte sind grün, die bei (2*Z*,6*E*)-FDP (**76**) blau bzw. die bei (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) schwarz gekennzeichnet. ^aZur besseren Vergleichbarkeit wurden die Retentionszeiten (Rt) des (3*R*)-d₆-NDP-Chromatogramms den anderen angepasst (Rt((3*R*)-d₆-**25**) = Rt + 0,06 min).

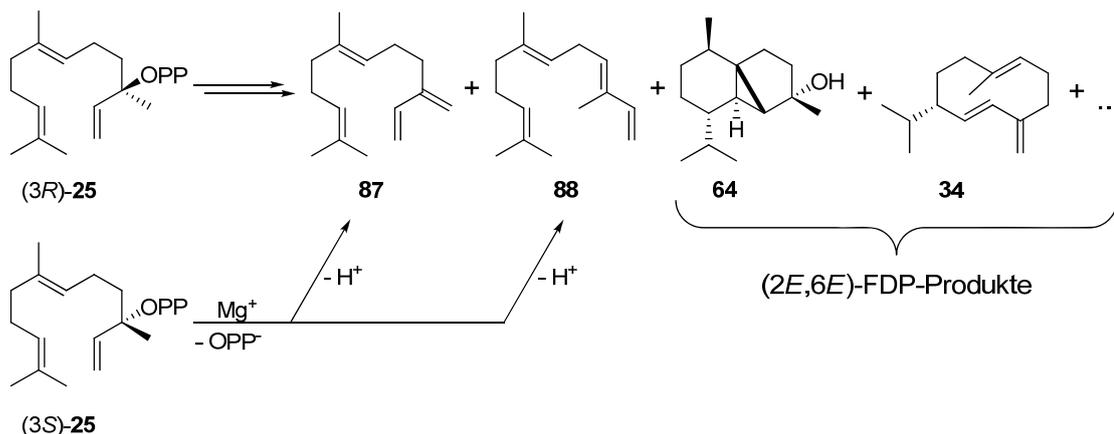


Abb. 32. Produkte die aus der Inkubation von (3R)-NDP ((3R)-25) und (3S)-NDP ((3S)-25) mit MtTPS5 hervorgehen.

Die prozentualen Verhältnisse der von (3R)-d₆-25 gebildeten zyklischen Produkte stimmten dabei in guter Näherung mit denen überein, die für das natürliche Substrat (2E,6E)-FDP (22) ermittelt wurden. Daraus folgte, dass (3R)-d₆-25 eine potentielle Zwischenstufe in der von MtTPS5 mit dem natürlichen Substrat 22 katalysierten Reaktionskaskade war. Markierungsexperimente mit D₂O sollten klären, ob (3R)-d₆-25 zum (2Z,6E)-Farnesylykation (26) oder zu dessen Doppelbindungsisomeren Kation 24 umgewandelt wurde. Die Einbauraten von Deuterium in Cadalan-Sesquiterpene waren vergleichbar mit denen, die durch die Inkubation von 22 in schwerem Wasser erhalten wurden. Das tertiäre allylische Substrat ging scheinbar überwiegend nach der Abspaltung des Diphosphatanions in das (2E,6E)-Farnesylykation (24) über. Nur ein kleiner Teil reagierte zu dessen (2Z)-Isomeren weiter, was die Detektion von etwa 3 % Humulan-4,9-dien-8-ol (98), dem (2Z,6E)-FDP (76) Hauptprodukt, vermuten ließ. In Konkurrenz-Inkubationsexperimenten wurden beide optischen Antipoden des NDP (25) in einem Verhältnis von (R):(S) 1:2 angeboten. Der hohe Deuteriumgehalt des Substrates (3R)-d₆-25 und der daraus resultierenden Produkte bewirkte eine Verschiebung der Retentionszeiten zu geringeren Werten im Vergleich zu den identischen unmarkierten Verbindungen, was eine gaschromatographische Trennung der Substanzen erlaubte. Die quantitative Analyse der Produktverhältnisse mittels GC-FID zeigte, dass das (3R)- gegenüber dem (3S)-Enantiomer im Verhältnis 5:1 bevorzugt wurde.

3.3.8.2 Inkubationen mit (2Z,6E)-Farnesyldiphosphat (76)

Im Produktprofil von MtTPS5, das in Gegenwart von (2Z,6E)-FDP (76) gebildet wurde, konnten 23 verschiedene Sesquiterpene detektiert werden, von denen 14 anhand ihrer Retentionsindizes und Massenspektren im Vergleich zu authentischen Referenzen identifiziert wurden (Abb. 31). Da in den zur Verfügung stehenden Massenspektrenbibliotheken kein zufriedenstellender Vorschlag für das Hauptprodukt **98** zu finden war, wurde die Struktur durch verschiedene Derivatisierungsreaktionen Schritt für Schritt ermittelt. Das Massenspektrum von **98** hatte einen schwachen Molpeak bei $m/z = 222$ und Fragmentationen bei $m/z = 207$ ($[M-CH_3]^+$) und $m/z = 204$ ($[M-H_2O]^+$), was auf einen Sesquiterpenalkohol hindeutete. Katalytische Hydrierung einer stark an **98** angereicherten Fraktion lieferte ein Produkt (**101**) mit einer um 4 amu erhöhten Masse des Fragmentations $[M-H_2O]^+$ $m/z = 208$. Daraus ließ sich ableiten, dass es sich bei

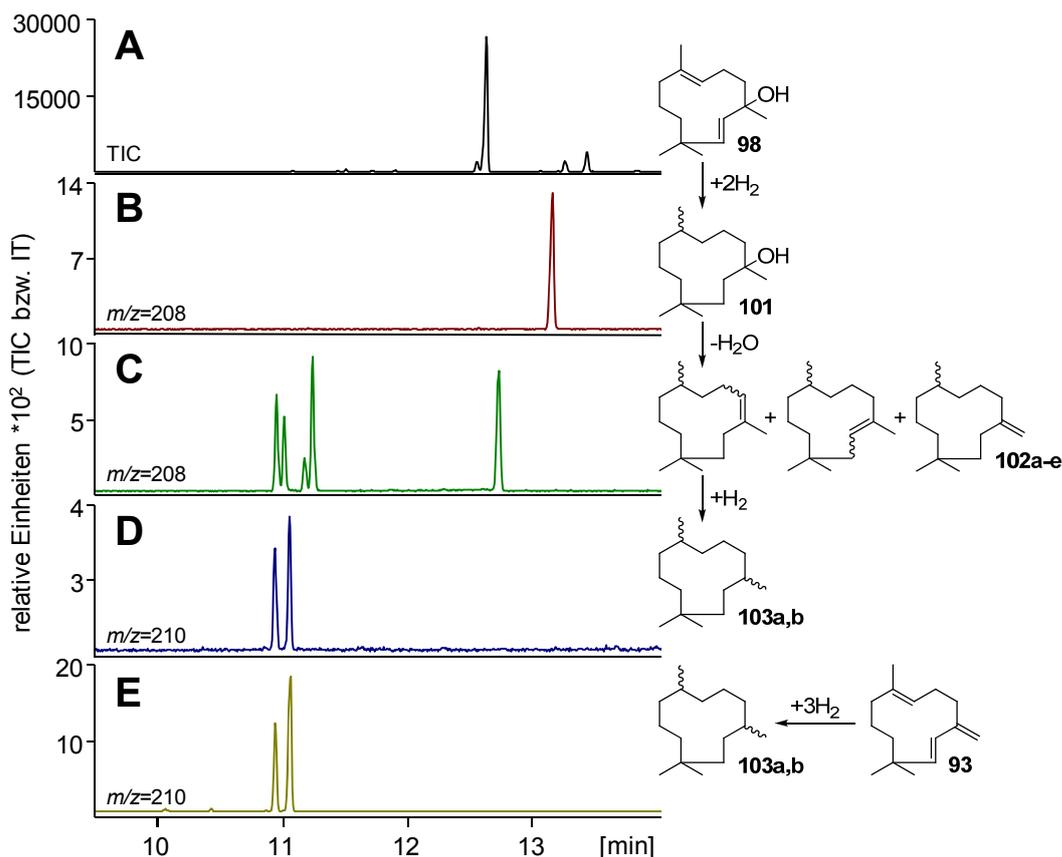


Abb. 33. Aufklärung der Struktur von Humulan-6,9-dien-3-ol (98). GC-MS Chromatogramme (TIC bzw. Ionenspur (IT)) die durch Reaktionen einer säulenchromatographisch an Kieselgel aufgereinigten Fraktion von **98** und dessen Folgeprodukten erhalten wurden. (A): an **98** angereicherte Fraktion, (B) Produkte nach katalytischer Hydrierung von **98**, (C) Produkte nach säurekatalysierter Dehydratisierung von **101**, (D) Produkte nach katalytischer Hydrierung von **102a-e**, (E) Referenz: aus **93** durch Hydrierung gewonnenes **103a,b**.

98 um ein monozyklisches System mit zwei Doppelbindungen handelte. Nach säurekatalysierter Dehydratation von **101** mit Trifluoressigsäureanhydrid konnten fünf Verbindungen (**102a-e**) gaschromatographisch getrennt werden, die den erwarteten Molpeak bei $m/z = 208$ besaßen. Aufgrund der Detektion von 5 stereoisomeren Produkten konnte die Hydroxygruppe nur an einem tertiären Kohlenstoffatom lokalisiert sein, da ein sekundärer Alkohol nur 4 Produkte und ein primärer Alkohol nur ein Produkt geliefert hätte. Der Nachweis, dass es sich bei **98** um ein 11-gliedriges Ringsystem handelte, gelang durch Hydrierung des Substanzgemisches **102a-e**, das die gleichen diastereomeren Humulane (**103a,b**) wie die Hydrierung von γ -Humulen (**93**) lieferte (Abb. 33). Eine Verbindung die allen experimentellen Befunden genügte, war Humula-4,9-dien-8-ol (**98**), das durch die Arbeitsgruppe um Pentegova aus dem Harz der Weißtanne (*Abies alba*) isoliert werden konnte.¹¹⁴

Im Produktspektrum von (2*Z*,6*E*)-FDP (**76**) überwiegen mono- und bityklische Sesquiterpene mit Humulan-, Amorphan- und Himachalan-Grundgerüsten, die bei der Umsetzung mit dem (*E*)-isomeren Substrat nicht beobachtet wurden. Um eine Rekonstruktion des stereochemischen Verlaufs der Reaktionskaskade zu ermöglichen, wurde die Absolutkonfiguration von α - und δ -Amorphen (**92**, **63**), α - und γ -Himachalen (**90**, **94**), sowie von α -Ylangen (**89**) mittels GC-MS an chiraler Phase bestimmt (Abb. 34, Anhang Abb. A-2). Wie bei (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) wurde bei den (2*Z*,6*E*)-FDP-Produkten jeweils nur ein Enantiomer jeder Verbindung detektiert. Demnach unterliegt die Produktbildung in beiden Fällen einer sehr hohen stereochemischen Kontrolle. Für α -Amorphen (**92**) war eine Bestimmung des Enantiomerenüberschusses nicht möglich, da das (+)-Enantiomer mit dem von (+)- δ -Amorphen ((+)-**63**) unter den verwendeten Trennbedingungen koeluierte (siehe Anhang, Tab. A-2). Alle Verbindungen besaßen wie die (2*E*,6*E*)-FDP-Produkte ein (*S*)-konfiguriertes Stereozentrum an C10. Im Gegensatz dazu wiesen die Brückenkopf-Wasserstoffatome (C1-H, C6-H) von α -Ylangen (**89**), sowie α - und δ -Amorphen (**92**, **63**) eine entgegengesetzte Orientierung zu den aus (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) gebildeten Verbindungen **51**, **62** und **65** auf (Abb. 34).

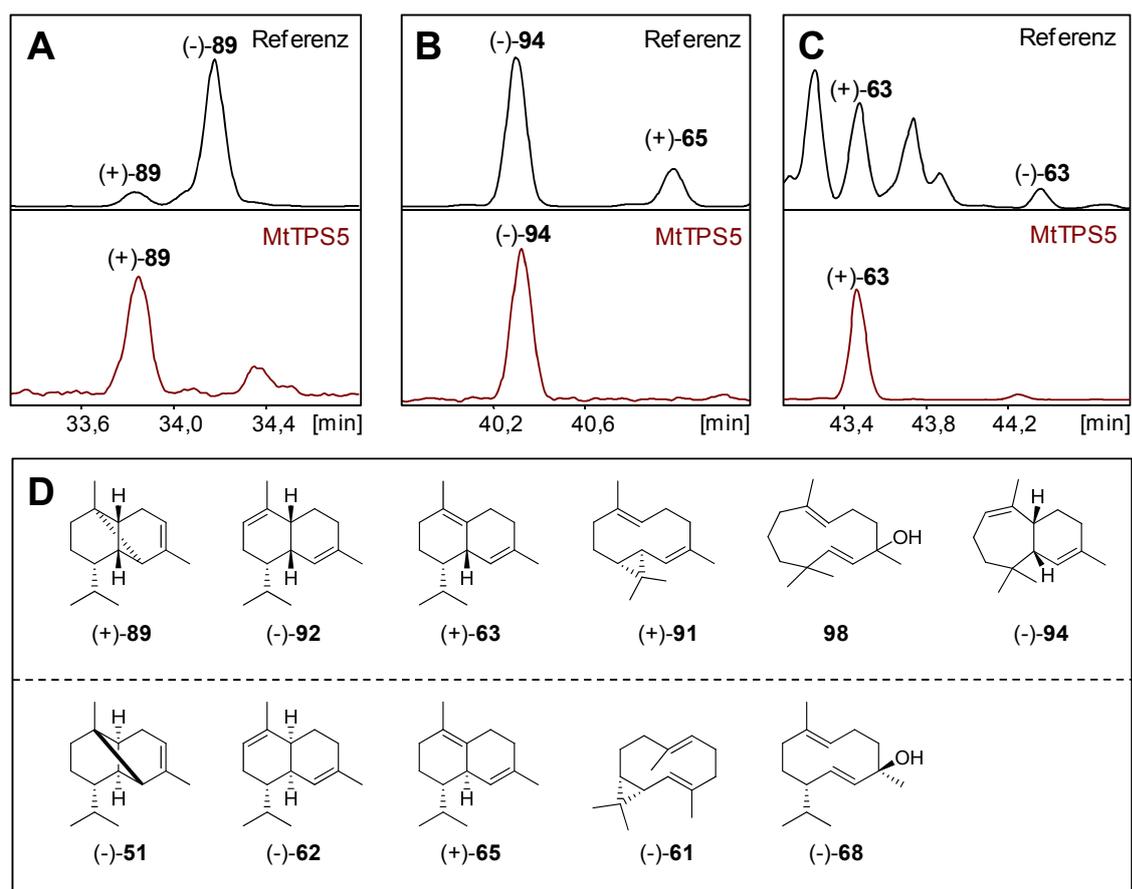


Abb. 34. Bestimmung der absoluten Konfigurationen einiger Produkte, die nach Inkubation von MtTPS5 mit (2*Z*,6*E*)-FDP (76) erhalten wurden. Die Trennung der Enantiomere erfolgte mittels GC-MS an chiraler Phase (gezeigt für 89 (A), 94 (B) und 63 (C)). (D): Gegenüberstellung von isomeren Verbindungen die ausgehend von (2*Z*,6*E*)-FDP (76) (obere Reihe) und (2*E*,6*E*)-FDP (22) gebildet werden (untere Reihe).

Aufgrund der bestimmten Absolutkonfigurationen der fünf (2*Z*,6*E*)-FDP-Produkte, ließen sich die Konfigurationen der Stereozentren der drei anderen bicyclischen Sesquiterpene (91, 95 und 100) ableiten. Basierend auf diesen stereochemischen Informationen und unter Verwendung des „Concept of least motion“¹⁰¹ wurde durch retrosynthetische Überlegungen die Startkonformation des (*Z*)-isomeren Substrates ermittelt (Abb. 35). Die Startkonformation bei der die Methylgruppen an C3 und C6 nach unten gerichtet waren, erwies sich als die wahrscheinlichste, da sich aus ihr zwanglos die beobachteten Konfigurationen an den Position C1, C6 und C10 ergaben (Abb. 35). Wie in vorangegangenen Abschnitten demonstriert wurde, ist der Schlüsselschritt für die Cadalanbildung ausgehend von (2*E*,6*E*)-FDP (22) die konformelle Änderung von Germacren D (34), gefolgt von einer Protonierung der exozyklischen Methylengruppe, wodurch eine Doppelbindungs-Isomerisierung der

C2-C3-Doppelbindung erreicht wird. (2*Z*,6*E*)-FDP (**76**) besitzt von vornherein die Doppelbindung in der Konfiguration, wie sie für die Ausbildung von Decalinsystemen benötigt wird. Um zu überprüfen, ob dennoch Protonentransfer-Reaktionen bei der

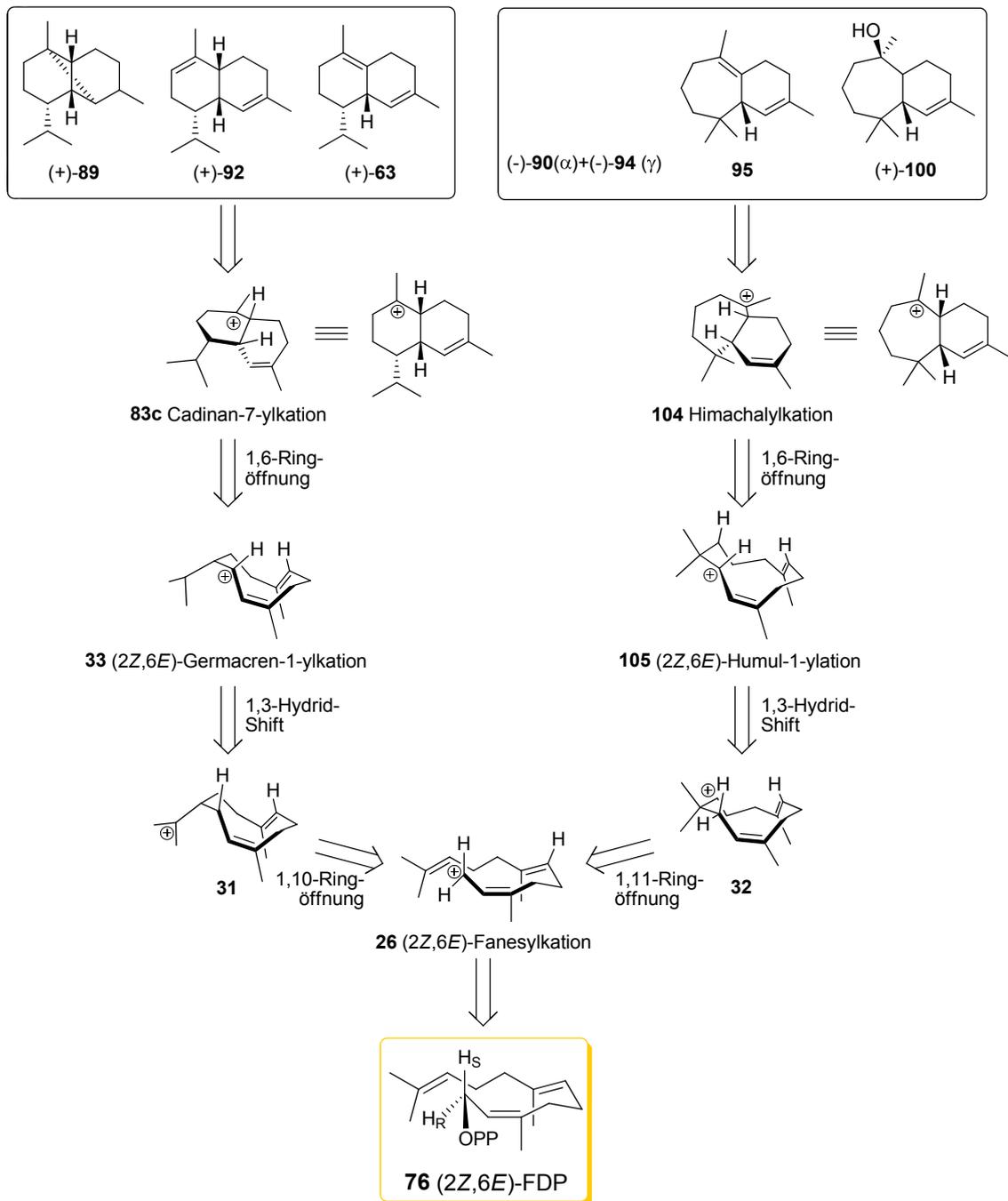


Abb. 35. Retrosynthetische Überlegungen zur Ermittlung der Startkonformation von (2*Z*,6*E*)-FDP (**76**) ausgehend von den ermittelten Absolutkonfigurationen der Enzymprodukte.

Bildung der (2Z,6E)-FDP-Produkte stattfinden, insbesondere bei den zu den Cadalan-Sesquiterpenen gehörenden Amorphanen, wurden Inkubationsexperimente in D₂O durchgeführt (vgl. Abschnitt 3.3.6). Wie erwartet, konnte kein Protonenübertrag auf die Produkte festgestellt werden, was sich in unveränderten Moleküllionen von $m/z = 204$ (bzw. $m/z = 222$ bei Alkoholen) in H₂O und D₂O niederschlug. Daraus lässt sich schließen, dass die Bildung aller Produkte aus **76** ohne protoneninitiierte Reaktionsschritte verläuft.

3.3.9 Modellierung von Enzym-Substratkomplexen

3.3.9.1 Das aktive Zentrum von MtTPS5

Um Einblicke in das aktive Zentrum von MtTPS5 aus *Medicago truncatula* zu erlangen und damit Rückschlüsse auf die bereits beschriebenen Produktspezifitäten in Anwesenheit verschiedener Substrate (vgl. Abschnitt 3.3.1 und 3.3.8) ziehen zu können, wurde ein Homologie-Modell für das Enzym in Zusammenarbeit mit Wolfgang Brandt und Eva Schulze (IPB Halle) erstellt. In den letzten Jahren ist die Anzahl der gelösten Kristallstrukturen von Terpensynthasen, die als mögliche Modellierungsvorlagen in Betracht kommen, stetig gestiegen.^{52,76,79} Durch Similaritätssuchen in einer Proteindatenbank¹¹⁵ mit Blastp¹¹⁶ wurde die 5-*epi*-Aristolochensynthase aus *Nicotiana tabacum* (TEAS) als geeignete Grundlage für die Modellentwicklung ausgewählt (PDB-Code: 1HXA). Ein Sequenzvergleich zeigte, dass die beiden Enzyme auf Aminosäureebene zu 43 % identisch und keine größeren Lücken im Alignment vorhanden waren. Die Tatsache, dass die Reaktionskaskade von TEAS, ebenso wie die von MtTPS5 einen Protonentransfer auf ein neutrales Intermediat beinhaltet, ist ein weiterer Grund für die Auswahl dieses Enzyms als Basis für das Homologie-Modell. Das *in silico* generierte dreidimensionale Strukturmodell von MtTPS5 in Abb. 36 zeigt den für Sesquiterpensynthasen typischen Aufbau aus einer katalytisch inaktiven N-terminalen Domäne und einer C-terminalen Domäne, die das aktive Zentrum beherbergt. Die Güte des Modells wurde mit PROCHECK¹¹⁷ und PROSA II¹¹⁸ überprüft und als sehr zuverlässig bewertet. So zeigte PROCHECK eine ausgezeichnete stereochemische Qualität, vergleichbar mit einer hochaufgelösten Röntgenstruktur.

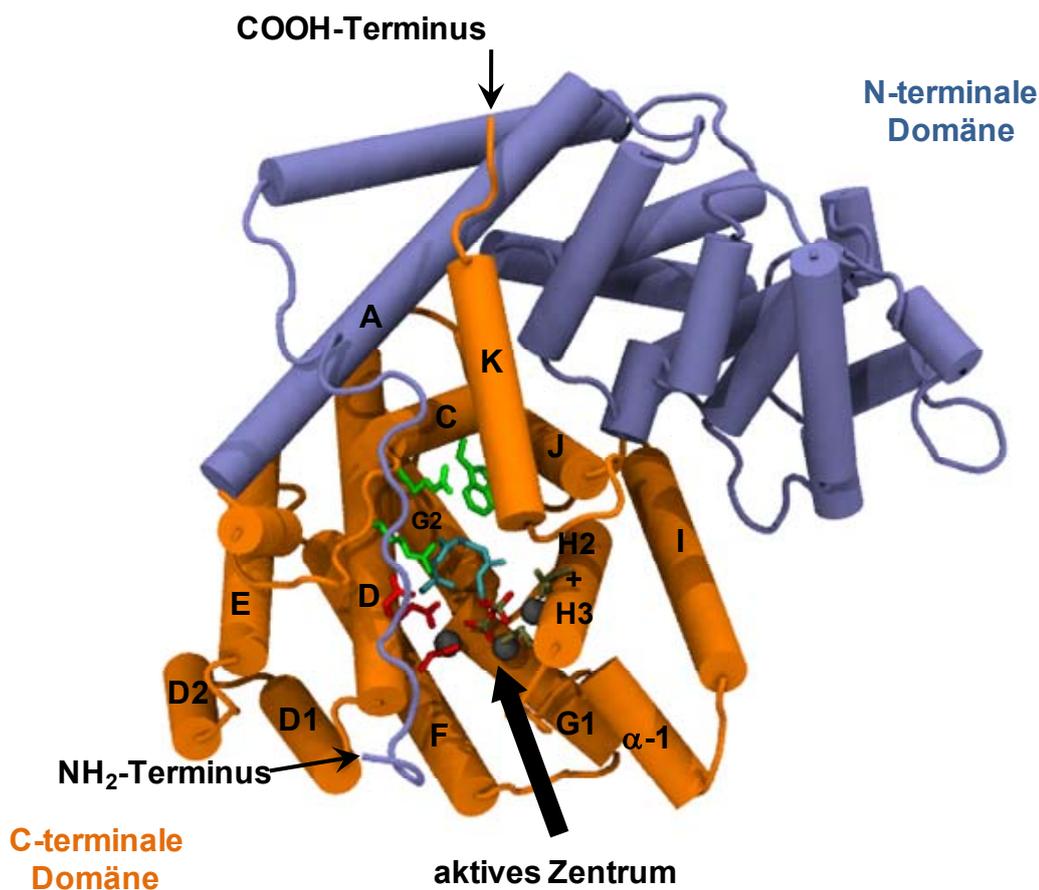


Abb. 36. Dreidimensionales Strukturmodell der MtTPS5 mit dem natürlichen Substrat (2E,6E)-FDP (22). Die C-terminale Domäne ist orange, die N-terminale Domäne ist blau dargestellt. Das Modell wurde auf Grundlage der 3D-Struktur der 5-*epi*-Aristolochensynthese aus Tabak erstellt.⁸³ Die Bezeichnungen der Strukturelemente erfolgt in Analogie zu Starks *et al.*⁸³ Weiterhin sind wichtige hochkonservierte Aminosäuren, die bei der Ausbildung des aktiven Zentrums beteiligt sind, dargestellt (RXXR₈W-, DDXXD-, NSE/DTE-Motiv).

Aus früheren Studien ist bekannt, dass die Aminosäuren des hochkonservierten DDXXD-Motivs (Helix D) und des gegenüberliegenden NSE/DTE-Motivs (Helix H), die einen dreikernigen Magnesiumionencluster koordinieren, am Eingang des aktiven Zentrums lokalisiert sind.^{74,83} In diesem Bereich der Struktur von MtTPS5 befindet sich eine relativ große Tasche, die mehrere Möglichkeiten zur Aufnahme des Substrates bietet (Abb. 37). Der Eingangsbereich der Tasche wird von geladenen Seitenketten der Asparaginsäurereste D306, D307 und D310 (DDXXD-Motiv) sowie der Glutaminsäurereste E458 (DSE-Motiv) und E384 gebildet, die über die Magnesiumionen den Diphosphatrest des Substrates koordinieren. Der unpolare Rest der Ausgangsverbindung ragt in das aktive Zentrum hinein, das von aromatischen (W278, Y409, F521, Y526, Y532) und unpolaren (C275, I299, G407, A408, L412, L518, M522) Seitenketten dominiert wird. Die Wechselwirkung mit diesen Resten

erlaubt die Stabilisierung des hydrophoben Teils des Substrates und der kationischen Zwischenstufen der Reaktionskaskade.

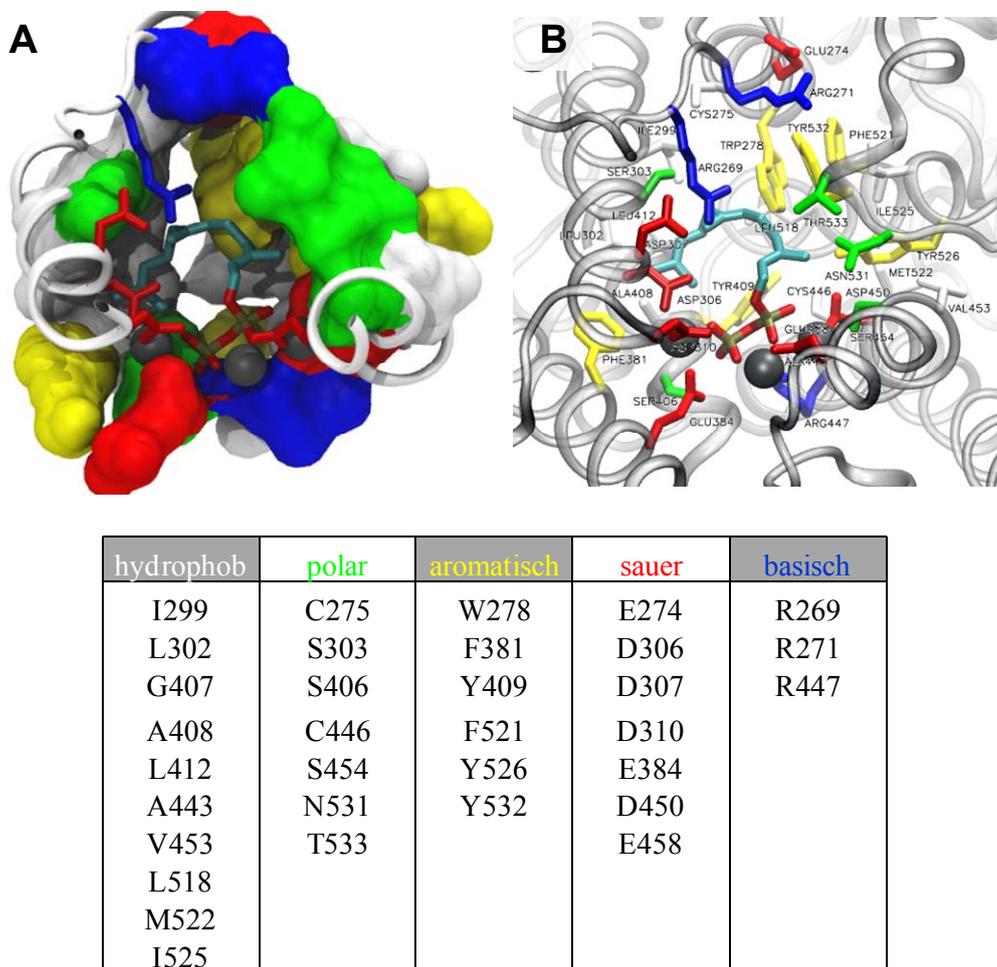


Abb. 37. Die am Aufbau des aktiven Zentrums beteiligten Aminosäuren. Die Aminosäuren wurden nach den Eigenschaften ihrer Seitenketten in Gruppen zusammengefasst und farblich kodiert (Tabelle). Die Abbildung zeigt die aktive Tasche mit (2E,6E)-FDP (**22**), dargestellt als Oberfläche (A) und als Stabmodell (B).

In Analogie zu TEAS findet in MtTPS5 eine Protonenübertragungsreaktion auf ein neutrales Germacren-Derivat statt, wie durch verschiedene Markierungsexperimente gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 3.3.7). Starks *et al.* postulierten, dass eine katalytische Triade bestehend aus D444, Y520 und D525 für die Reprotonierung von Germacren A (**36**) verantwortlich ist, wobei die essentielle Rolle des Tyrosinrestes in späteren Mutationsstudien bewiesen werden konnte.^{83,84} In MtTPS5 konnten an äquivalenten Positionen in der Sequenz die entsprechenden Aminosäuren identifiziert werden (D450, Y526, D530). Die Überlagerung der Strukturmodelle von TEAS und

MtTPS5 verdeutlichte, dass die Seitenketten des Strukturmotives unterschiedliche Konformationen besaßen (Abb. 38). Besonders die Asparaginsäure D530 von MtTPS5 war im Vergleich zu der korrespondierenden Aminosäure D525 in TEAS in die entgegengesetzte Richtung orientiert, wodurch sich der Abstand zwischen den Sauerstoffatomen der Säuregruppe und der phenolischen OH-Gruppe auf fast 10 Å vergrößerte. Dadurch sind direkte Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Seitenketten, wie zwischen Y520/D525 (TEAS), nicht möglich. Vermutlich ist für die Protonenübertragung die Aktivierung durch D450 ausreichend. Da aber keine weiteren Mutationsexperimente durchgeführt wurden, bleibt diese Feststellung spekulativ.

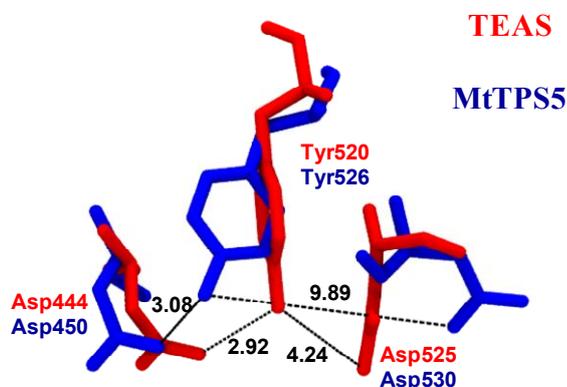


Abb. 38. Die katalytische Triade von TEAS (rot) im Vergleich mit den korrespondierenden Aminosäuren von MtTPS5 (blau). Die Abstände zwischen den entsprechenden Sauerstoffatomen sind schwarz eingezeichnet und in Ångström (Å) angegeben.

3.3.9.2 Modellierung von Enzym-Substrat-Komplexen

Um weitere Informationen über die strukturellen Grundlagen der verschiedenen Produktspezifitäten in Gegenwart von den Substraten (2*E*,6*E*)- und (2*Z*,6*E*)-FDP (**22**, **76**), sowie (3*R*)- und (3*S*)-NDP (**25**) zu erhalten, wurden diese in das berechnete Strukturmodell von MtTPS5 gedockt. Die Dockingexperimente wurden mit dem Programm PLANTS¹¹⁹ durchgeführt, wobei die Konformationen ausgewählter Seitenketten einer zuvor optimierten Struktur geändert wurden, um eine möglichst gute Wechselwirkung mit dem Liganden zu erzielen. Als beweglich wurden die Seitenketten von Y526 aufgrund der vermuteten katalytischen Bedeutung sowie die von R269, W278 und Y532 aufgrund ihrer Größe und Lage im aktiven Zentrum gewählt (Abb. 39). Insbesondere die aromatischen Aminosäuren W278 und Y532 waren dabei interessant, da sie durch π - π -Wechselwirkungen kationische Zwischenstufen stabilisieren und durch

ihre Beweglichkeit die Intermediate auf ihrem Reaktionsweg „begleiten“ können.⁵⁷ Desweiteren könnte die Aminosäure W278, die die hintere Begrenzung der Tasche bildet, bei entsprechender Konformation den Reaktionsraum in zwei Hälften teilen und somit das Substrat in den rechten oder linken Teil dirigieren.

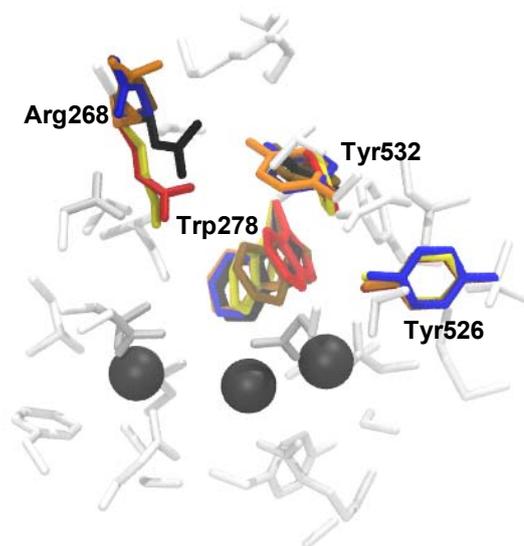


Abb. 39. Konformell veränderliche Aminosäuren bei Dockingstudien mit (2E,6E)-FDP (22). Dargestellt sind 5 verschiedene Protein-Ligand-Komplexe (Komplex 1: rot; Komplex 2: schwarz; Komplex 3: blau; Komplex 4: orange; Komplex 10: gelb). Farblich grau gekennzeichnete Aminosäuren zeigten keine Konformationsänderungen. Aus Übersichtlichkeit sind Wasserstoffatome und Substrat nicht dargestellt.

Insgesamt wurden für jedes Substrat 30 Protein-Ligand-Komplexe berechnet, wobei jedem Komplex ein gewisser Score-Wert zugeordnet wurde, der die Wechselwirkung zwischen Protein und Ligand beschrieb. Dieser Wert diente bei der folgenden Bewertung als Anhaltspunkt für die Beurteilung der Ergebnisse, doch entspricht die am besten bewertete nicht unbedingt der realen Konformation. Aus diesem Grund wurden alle Strukturen mit Hilfe von VMD¹²⁰ visualisiert und die Konformationen der Substrate unter folgenden Gesichtspunkten analysiert:

- (i) Ist das Substrat schon in einem Zyklus präformiert oder handelt es sich um eine gestreckte Konformation?
- (ii) Sind die Reaktionszentren in räumlicher Nähe, so dass eine Bindungsbildung möglich ist?

- (iii) Führt der Ringschluss zwischen C1 und C10 zu den beobachteten (*R*)-konfigurierten (*2E,6E*)- bzw. (*2Z,6E*)-Germacren-11-ylkationen ((*2E,6E*)- bzw. (*2Z,6E*)-FDP)?
- (iv) Stehen die beiden Methylgruppen an C3 und C7 in einer günstigen Anordnung, so dass durch die zweite Zyklisierung die entsprechend konfigurierten Cadalane entstehen (*cis* bei (*2E,6E*)-FDP (**22**), *trans* bei (*2Z,6E*)-FDP (**76**))?

Von den 30 berechneten Ligandkonformationen für das natürliche Substrat (*2E,6E*)-FDP (**22**) erfüllten nur vier die Bedingungen (i) und (ii) von denen wiederum nur eine Konformation alle vier Bedingungen (i-iv) erfüllte, die dem besten Score-Wert entsprach. Interessanterweise zeigte bei allen zyklischen Konformationen die Methylgruppe an C3 in Richtung der postulierten katalytischen Diade (D450, Y526), die für die Protonenübertragung auf diese Position im späteren Reaktionsverlauf (auf Stufe des Germacren D) verantwortlich gemacht wurde. Die räumliche Nähe der potentiellen Protonenquelle und des Akzeptors untermauern die wichtige Rolle der Hydroxylgruppe des Y526 in der Protonenübertragungsreaktion, die durch Mutagenese- und Markierungsexperimente bewiesen werden konnte (siehe Abschnitt 3.3.7). Im Gegensatz dazu konnte bei der *in silico* Analyse von (*2Z,6E*)-FDP (**76**) keine zyklisierungsfähigen Konformationen gefunden werden, bei der die Methylgruppe an C3 in der näheren Umgebung von Y526 lokalisiert war (Abb. 40). Dies steht im Einklang mit D₂O-Markierungsexperimenten, bei denen keine markierten Produkte gefunden wurden. Insgesamt konnten 7 Konformationen identifiziert werden, die eine Zyklisierung zu einem zehn- bzw. elfgliedrigen Ring (C1-C10 bzw. C1-C11) erlaubten. Nur eine dieser Konformationen führte zu der beobachteten Stereochemie der Brückenkopfwasserstoffatome der Himachalane und Amorphane (Abb. 40). Bei den enantiomeren Nerolidyldiphosphatsubstraten waren die Ergebnisse weniger aussagekräftig. Zwar wurde beim (*R*)-Enantiomer einige Konformation gefunden, die bei einem C1-C10-Ringschluss und der folgenden C1-C6-Zyklisierung zu den beobachteten Konfigurationen an C1, C6 und C10 geführt hätten, doch stand das Kohlenstoffatom C15 nicht in der richtigen Position für eine Protonenübertragung, die durch Markierungsexperimente nachgewiesen wurde. Im Falle des (*3S*)-NDP ((*3S*)-**25**) waren die bevorzugten Konformationen zyklisch. Diese Beobachtung kann jedoch die Bildung von ausschließlich azyklischen Produkten nicht erklären.

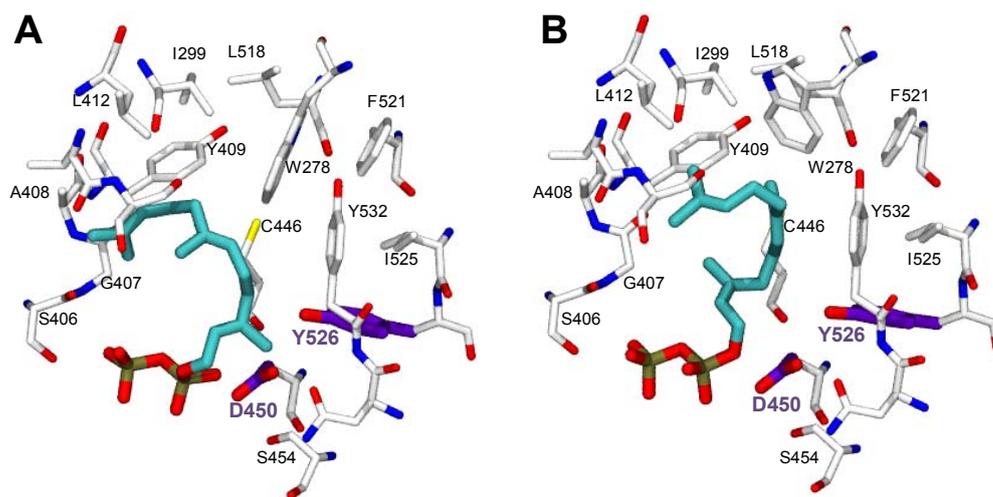


Abb. 40. Durch Dockingstudien erhaltene Enzym-Substratkomplexe mit (2E,6E)-FDP (22) (A) und (2Z,6E)-FDP (76) (B). Die Konformationen wurden auf Grundlage der Absolutkonfiguration der gebildeten Produkte ausgewählt. Die an der Protonenübertragung vermutlich beteiligten Aminosäuren sind violett hervorgehoben. Das Substrat ist Türkis dargestellt.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle der Terpensynthasen MtTPS1, MtTPS3 und MtTPS5 bei der induzierten Duftstoffemission in *Medicago truncatula*

Medicago truncatula emittiert eine große Bandbreite an flüchtigen Verbindungen, die abhängig vom Stressfaktor eine große Variation hinsichtlich ihrer Zusammensetzung zeigen. Das Produktspektrum umfasst dabei verschiedene Alkane, Alkene, Aldehyde, Alkohole, Ester und Aromaten, wobei die Verbindungsklasse der Sesquiterpene den Hauptbestandteil bildet.⁹² Durch Analysen von EST-Datenbanken von *Medicago truncatula* konnten insgesamt sechs putative Terpensynthasegene (*MtTPS*) identifiziert werden.^{96,98} Wie die Untersuchungen der Transkriptionslevel der verschiedenen *MtTPS*-mRNAs zeigten, sind die entsprechenden Gene durch Verwundung bzw. Behandlung mit chemischen Elicitoren induzierbar.^{96,98} Um die Mitwirkung der einzelnen Terpensynthasen an der chemischen Verteidigungsstrategie von *Medicago truncatula* besser zu verstehen, wurden MtTPS1, MtTPS3 und MtTPS5 (diese Arbeit) sowie MtTPS4 hinsichtlich ihrer Aktivität näher untersucht. Dabei zeigte sich, dass es sich bei MtTPS4 um eine Monoterpensynthase handelte, die für die Emission von (*E*)- β -Ocimen nach Fraßbefall durch die Schmetterlingslarve *Spodoptera exigua* verantwortlich war.⁹⁷ Um die Beteiligung der drei Terpensynthasen MtTPS1, MtTPS3 und MtTPS5 an der Bildung der Duftprofile von *Medicago truncatula* aufzuklären, wurde die VolllängencDNA der jeweiligen Enzyme in einen Vektor kloniert und in *E. coli* exprimiert. Die Analyse der Produkte von MtTPS1 und MtTPS5 in Gegenwart der all-*trans*-Substrate Geranyl-, Farnesyl- und Geranylgeranyldiphosphat (GDP (**21**), FDP (**22**), GGDP (**23**)) zeigte, dass es sich bei den Proteinen *in vitro* um Sesquiterpensynthasen handelte, da die Aktivität in Gegenwart von GDP (**21**) (Monoterpene) um den Faktor 20 niedriger als bei Umsetzungen mit FDP (**22**) (Sesquiterpene) war. Die zytosolische Lokalisation von MtTPS1, die durch Protein-Chloroplast-Import-Assays gezeigt wurde, ist ein weiterer Beleg für die Sesquiterpenaktivität, die im Allgemeinen in diesem Zellkompartiment stattfindet.^{96,121} MtTPS1 wandelte das C₁₅-Substrat FDP (**22**) zu (-)-(*E*)- β -Caryophyllen (**53**) (92 %) und α -Humulen (**56**) (8 %) um. Aufgrund des gleichen Verhältnisses der beiden Verbindungen im Duftspektrum und der erhöhten Transkriptakkumulation der *MtTPS1*-mRNA nach mechanischer Verwundung bzw. nach *Spodoptera exigua*-Herbivorie ist zu vermuten, dass MtTPS1 für die Produktion dieser beiden Duftstoffe verantwortlich ist (Abb. 41).^{96,98} Im Gegensatz zu MtTPS1 konnten von den 27 Sesquiterpenen, die durch die Umsetzung von MtTPS5 mit (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) gebildet

wurden, nur einige Kohlenwasserstoffe im induzierten Duftstoffspektrum identifiziert werden (Abb. 41). Allein α -Copaen (**51**) wird dabei in größeren Mengen von den Blättern nach Verwundung emittiert, wohingegen die anderen MtTPS5-Produkte nur in sehr geringen Mengen, und in einem vom *in vitro*-Produktspektrum abweichenden Verhältnis, gebildet werden. Besonders auffällig ist, dass im Duftbouquet von *M. truncatula* keine Sesquiterpenalkohole beobachtet werden, die MtTPS5 *in vitro* in großen Mengen bildet (z. B. Cubebol (**64**) oder Copan-3-ol (**67**)). Da generell angenommen wird, dass die Terpenbildung auf Transkriptebeine von Terpensynthasegenen reguliert wird^{53,94,122}, wurde eine stärkere Beteiligung von MtTPS5 bei der Bildung der induzierten Duftstoffe erwartet, besonders vor dem Hintergrund der hohen Transkriptakkumulation von *MtTPS5*-mRNA nach Herbivorenbefall.⁹⁸ Wahrscheinlich wird die Synthese dieses Enzyms durch bisher nicht untersuchte Faktoren reguliert. Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass die Art der Regulation in manchen Fällen eine große Komplexität besitzt, wobei unterschiedliche Einflüsse das Gesamtbild bestimmen.^{43,121,123,124} Die Produktspezifität von MtTPS5 könnte aber auch *in vivo* durch verschiedene Faktoren dahingehend moduliert werden, dass die Bildung der Alkohole stark unterdrückt wird. Ein Hinweis, dass dies prinzipiell möglich ist, lieferten Experimente bei denen anstatt Magnesium-, Manganionen als Kofaktoren verwendet wurden. Dabei verschob sich die Produktspezifität deutlich in Richtung Sesquiterpenkohlenwasserstoffe (Mg^{2+} : 32 %, Mn^{2+} : 69 % Anteil am Gesamtprodukt). Ein ähnlicher Effekt wurde bei einer Amorpha-4,11-dien Synthese aus *Artemisia annua* L. festgestellt, wo durch Anwesenheit von Mn^{2+} - oder Co^{2+} -Kofaktoren die Bildung von Nebenprodukten, insbesondere von Alkoholen, stark reduziert wurde.¹²⁵ Obwohl für MtTPS5 ein signifikant geringerer K_m -Wert für Mn^{2+} -Ionen im Vergleich zu Mg^{2+} -Ionen ermittelt wurde, ist es wahrscheinlicher, dass in der Pflanze Magnesiumionen als Kofaktoren dienen, da deren Konzentration im Zytosol um zwei Größenordnungen höher liegt, als die der Manganionen.^{95,126} Nachgeschaltete Modifikationen, wie Glykosylierung oder Acetylierung, wie sie für verschiedene Terpenalkohole nachgewiesen wurden, könnten eine weitere Erklärung für das Fehlen von hydroxylierten MtTPS5-Produkten sein.^{15,123} Letztendlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Produkte von MtTPS5 Intermediate des Sekundärmetabolismus sind und daher nicht freigesetzt, sondern weiter zu anderen Verbindungen umgesetzt werden, wie es z. B. für γ -Cadinen⁶⁹, δ -Cadinen^{56,127}, Trichodien¹⁰³ oder Pentalen¹²⁸ beschrieben wurde.

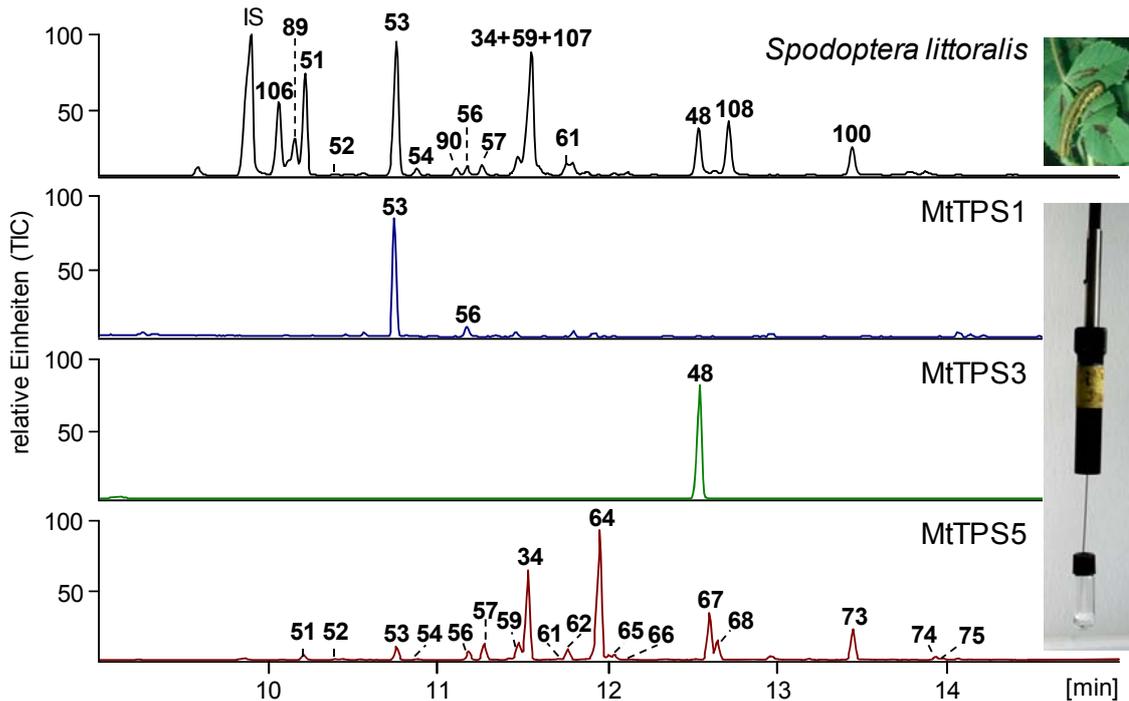


Abb. 41. Vergleich des Duftstoffprofils von *Medicago truncatula* nach Befall mit *Spodoptera littoralis* mit den *in vitro*-Sesquiterpenprodukten von MtTPS1, MtTPS3 und MtTPS5 nach Inkubation mit (2*E*,6*E*)-FDP (22). Die Produkte der Terpensynthasen wurden mittels SPME gesammelt und per GC-MS analysiert. Die Sesquiterpene von *M. truncatula* wurden mittels „Closed loop stripping“ an Aktivkohle adsorbiert und mit Dichlormethan eluiert. Als interner Standard (IS) diente dabei *n*-Bromdecan ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$). Die Produkte wurden als 106 Cyclosativen, 89 α -Ylängen, 51 α -Copaen, 52 β -Cubeben, 53 (*E*)- β -Caryophyllen, 54 β -Copaen, 90 α -Himachalen, 56 α -Humulen, 57 *allo*-Aromadendren, 59 γ -Muuroolen, 34 Germacren D, 107 $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$, 61 Bicyclogermacren, 62 α -Muuroolen, 64 Cubebol, 65 δ -Cadinen, 66 Cadina-1,4-dien, 48 Nerolidol, 67 Copan-3-ol, 68 4 α -Hydroxygermacra-1(10),5-dien, 108 TMTT, 100 2-Himachalen-7-ol, 73 Torreyol, 74 Kunzeaol, 75 $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ -I identifiziert.

Die Fähigkeit, sowohl GDP (21), FDP (22) als auch GGDP (23) in die entsprechenden tertiären (3*S*)-Alkohole zu überführen, kennzeichnet die MtTPS3 als ein ungewöhnliches Enzym. Die in der Literatur beschriebenen Linalool-, Nerolidol- bzw. Geranylinaloolsynthasen sind in der Lage, nur ein oder zwei Substrate in die allylischen Alkohole zu überführen.^{41,42,129-135} Eine Multifunktionalität gegenüber drei verschiedenen Prenyldiphosphaten wurde bis jetzt nur für die Elisabethatriensynthase (Diterpensynthase) aus der Koralle *Pseudopterogorgia elisabethae* beschrieben.¹³⁶ Das natürliche Substrat GGDP (23) wird von der Diterpensynthase spezifisch zu einem einzigen Produkt zyklisiert, wohingegen mit abnehmender Kettenlänge des Substrates die Neigung zur Multiproduktbildung stark zunimmt und gleichzeitig die kinetische Effektivität der Katalyse abnimmt.¹³⁶ MtTPS3 zeigte in *in vitro*-Konkurrenzassays, bei denen alle drei Substrate in äquimolaren Mengen angeboten wurden, eine bevorzugte

Bildung von (3*S*)-Nerolidol ((3*S*)-**48**), einem Sesquiterpenprodukt. Jedoch deuteten die Ergebnisse der Aminosäuresequenzanalyse auf einen plastidären Ursprung der Synthese hin, da die identifizierte N-terminale Transitsequenz für das Protein die Passage durch die Membran ermöglichen sollte.⁹⁶ Durch Protein-Chloroplast-Import-Assays konnte von Gomez *et al.* die Lokalisation von MtTPS3 in Plastiden nachgewiesen werden.⁹⁶ Daraus folgt, dass MtTPS3 höchstwahrscheinlich *in planta* an der Biosynthese von Mono- oder Diterpenen beteiligt ist. Trotz der hohen Transkriptakkumulation der *MtTPS3*-mRNA nach Befall durch *S. littoralis*, konnten im induzierten Duftbouquet weder Linalool (**46**) noch Geranylinalool (**49**) nachgewiesen werden. Stattdessen bilden Nerolidol und (3*E*)-Dimethyl-1,3,7-nonatrien (**109**, DMNT) und (3*E*,7*E*)-Trimethyl-1,3,7,11-tetraen (**108**, TMTT) einen großen Teil des emittierten Duftspektrums (Abb. 41). Die beiden Homoterpene DMNT (C₁₁) (**109**) und TMTT (C₁₆) (**108**) sind oxidative Abbauprodukte von Nerolidol (**48**) und Geranylinalool (**49**) (Abb. 42).^{121,137-139} Aus der nachgewiesenen plastidären Lokalisation folgt, dass MtTPS3 eine ähnliche Funktion wie eine Geranylinaloolsynthase (TPS04/GES) aus *Arabidopsis thaliana* ausüben könnte, die an der Produktion von TMTT beteiligt ist.¹³⁹ Eine andere Funktion von MtTPS3 könnte durch posttranslationale Modifikationen des Enzyms hervorgerufen werden, die in einer zytosolischen Lokalisation resultiert. In diesem Fall könnte die Synthese für die Produktion von Nerolidol (**48**) bzw. DMNT (**109**) verantwortlich sein. Eine bifunktionelle Linalool-/Nerolidolsynthase (AmNES/LIS-2) aus *Antirrhinum majus* (Großes Löwenmäulchen oder „snapdragon“), die im Plastiden lokalisiert ist (Produktion von Linalool), konnte nach Abspaltung einer 30 Aminosäure langen Transitsequenz *in planta* in eine Nerolidolsynthase umgewandelt werden.⁴¹ Das Angebot an Substraten in den jeweiligen Kompartimenten könnte ein weiterer bestimmender Faktor für die MtTPS3-Aktivität in *M. truncatula* sein. So konnte bei Untersuchungen der Terpenbiosynthese in Arabidopsis- und Kartoffelpflanzen gezeigt werden, dass auch in Plastiden ein kleiner Pool an FDP (**22**) existiert, wobei die Konzentration von GDP (**21**) diejenige von FDP (**22**) bei weitem übersteigt.^{43,140,141} Um die genaue Funktion von MtTPS3 in *M. truncatula* zu bestimmen, sind weitere Untersuchungen nötig, die im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden konnten.

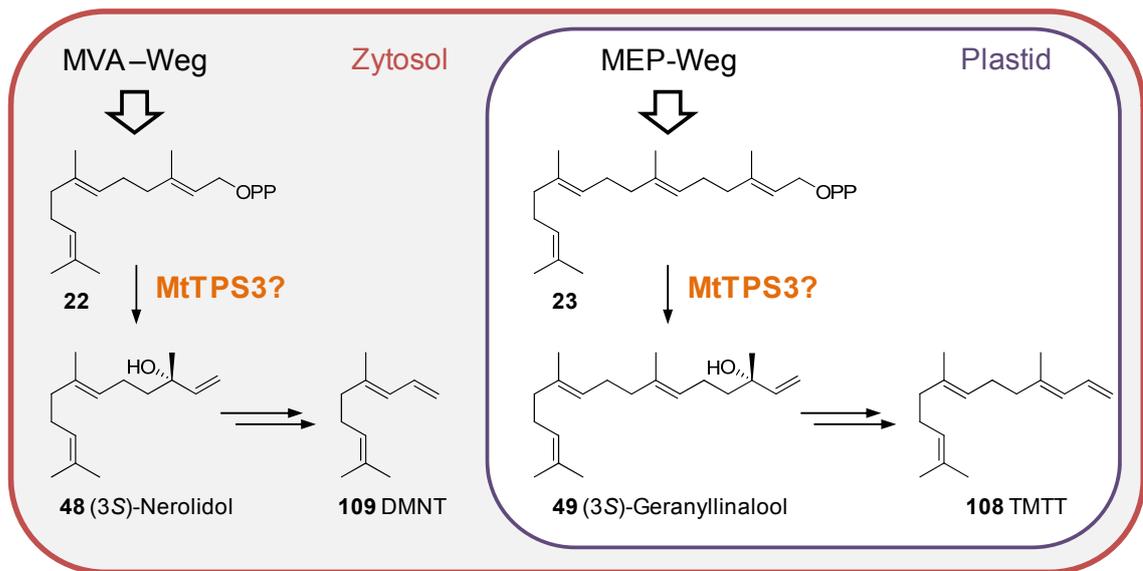


Abb. 42. Mögliche Funktionen von MtTPS3 bei der Bildung von Duftstoffen in *Medicago truncatula*.

Die drei in dieser Arbeit charakterisierten Terpensynthasen können das emittierte Sesquiterpenproduktspektrum von *M. truncatula*, als Reaktion auf den Befall mit *Spodoptera littoralis*, nicht vollständig erklären. Ein wesentlich größerer Anteil sollte somit den noch nicht charakterisierten Enzymen MtTPS2 und MtTPS6 zukommen, wobei es sich auf Grundlage der Aminosäuresequenzen bei MtTPS2 um eine Sesqui- und bei MtTPS6 um eine Mono- oder Diterpensynthase handeln sollte.⁹⁶ Darüber hinaus könnten noch weitere unbekannte Terpensynthasegene im Genom von *M. truncatula* vorhanden sein, die von den bisher verwendeten degenerierten Primern nicht erfasst wurden.

4.2 Die biochemischen Eigenschaften der MtTPS5

Eine detaillierte Analyse der Sesquiterpensynthase MtTPS5 ergab, dass die biochemischen Charakteristika dieses Enzyms sehr gut mit denen bekannter Terpensynthasen aus anderen Pflanzen übereinstimmen. Das Gen von *MtTPS5* kodiert für ein 553 Aminosäuren langes Protein mit einem berechneten Molgewicht von 67 kDa. Durch Gelfiltration konnte eine molare Masse von 70 kDa ermittelt werden, was mit dem errechneten Wert im Rahmen der Messgenauigkeit gut übereinstimmt. Da die Bestimmung unter nativen Bedingungen ablief, kann weiterhin gefolgert werden,

dass es sich bei der Synthese *in vitro* um ein Monomer handelt. Beide Eigenschaften sind im Einklang mit denen für isolierte Sesquiterpensynthesen in der Literatur beschriebenen Werte.¹⁴² Nach Inkubation des in *E. coli* exprimierten und über einen His-tag aufgereinigten Proteins mit (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) wurden 27 verschiedene Produkte identifiziert. Die Umsetzung mit GDP (**21**) lieferte ebenfalls verschiedene Produkte, jedoch mit einer um den Faktor 20 reduzierten Umsatzrate. Aufgrund des Fehlens einer aminoterminalen Transitsequenz, der stark verminderten Fähigkeit GDP umzusetzen und der Inaktivität gegenüber GGDP (**23**) wurde MtTPS5 als Sesquiterpensynthese identifiziert. Die Eigenschaft von MtTPS5 neben FDP (**22**) auch GDP (**21**) *in vitro* zu zyklisieren, konnte auch für viele andere Sesquiterpensynthesen nachgewiesen werden.^{55,143,144} Es wird vermutet, dass für Sesquiterpensynthesen kein evolutionärer Druck zur Differenzierung zwischen FDP (**22**) und GDP (**21**) besteht, da das *in vivo* in den Plastiden gebildete Substrat GDP (**21**) der zytosolischen Sesquiterpensynthese nicht zur Verfügung steht.^{55,142} Eine entscheidende Rolle spielt auch die Größe der enzymatischen Tasche von MtTPS5. Diese ist groß genug um FDP (**22**) und das kleinere C₁₀-Substrat aufzunehmen und umzusetzen, wohingegen das im Vergleich zu **22** um fünf Kohlenstoffatome längere GGDP (**23**) nicht mehr in das aktive Zentrum aufgenommen werden kann. Die kinetischen Parameter für (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) liegen mit 4,6 μM für den K_m-Wert, 1,5 · 10⁻² s⁻¹ für die katalytische Konstante (k_{cat}) und 3,3 · 10³ M⁻¹ s⁻¹ für den k_{cat}/K_m-Wert in dem für Pflanzen typischen Bereichen.^{63,145} Terpensynthesen benötigen für ihre Aktivität im Allgemeinen divalente Metallionen als Kofaktoren, die eine wichtige Rolle einerseits bei der Substratbindung und andererseits bei der Initiierung der Reaktionskaskade spielen, indem sie die Abspaltung der Diphosphatgruppe forcieren. Von acht verschiedenen Kofaktoren, die in Kombination mit (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) untersucht wurden, zeigte die Synthese nur in Anwesenheit von Mangan- und Magnesiumionen nennenswerte Aktivität. In Übereinstimmung mit der Literatur wird die maximale Enzymaktivität bei Mn²⁺-Ionen schon bei weit niedrigeren Konzentrationen als für Mg²⁺-Ionen erreicht, was der um den Faktor 50 niedrigere K_m-Wert für Manganionen (Mn²⁺: 23 μM, Mg²⁺: 1205 μM) zeigt.^{67,143-147} Wie bei Terpensynthesen aus anderen Organismen beobachtet, hatte der Kofaktor große Auswirkungen auf die Produktzusammensetzung von MtTPS5.^{95,125,143} Insbesondere scheinen die divalenten Metallionen die Übertragung von Protonen auf neutrale Intermediate zu beeinflussen. So verschiebt sich das Verhältnis der Produktmengen der Cadalane und Germacrane in Gegenwart von Manganionen hin zu den Germacranen,

was für eine reduzierte Protonenübertragung auf Germacren D (**34**) spricht. Ein ähnlicher Effekt konnte bei den Sesquiterpensynthesen TPS6 und TPS11 aus Mais beobachtet werden, bei denen ebenfalls eine geringere Menge an Protonierungsprodukt in Anwesenheit von Mn^{2+} -Ionen im Vergleich zu Mg^{2+} -Ionen beobachtet werden konnte.⁶⁷ Zurzeit ist nicht klar, ob die verschiedenen Metallionen die Protonenübertragung direkt beeinflussen oder ob die unterschiedlichen Koordinationsgeometrien der Metall-Substrat-Protein-Komplexe einen indirekten Effekt ausüben, indem sie Veränderungen der Substratkonformationen und/oder der Architektur des aktiven Zentrums bewirken. Als weiteren, die Produktspezifität von MtTPS5 beeinflussenden Faktor, stellte sich der pH-Wert heraus. Während um $pH = 5,5$ ein nahezu gleiches Verhältnis von Cadalanen zu Germacranen vorlag, steigerte sich der Mengenanteil der Cadalane mit zunehmendem pH-Wert und erreichte bei $pH = 7,5$ sein Maximum, um anschließend wieder abzufallen. Bei Germacren D (**34**) wurde ein gegenläufiger Trend beobachtet. Diese Ergebnisse sind ein weiter Beleg dafür, dass die Biosynthese der Cadalane von **34** abhängt, wie es durch die in vorangegangenen Abschnitten beschriebenen Markierungsexperimente bewiesen wurde. Daraus lässt sich ableiten, dass bei sehr niedrigen und sehr hohen pH-Werten die Übertragung eines Protons stark gestört ist, wodurch die vermehrte Freisetzung des neutralen Intermediates **34** begünstigt wird. Ähnliche Abhängigkeiten des Produktspektrums vom pH-Wert wurden für die Macrocarpen-Synthesen TPS6 und TPS11 aus Mais berichtet, bei denen ebenfalls ein Proton durch einen Tyrosinrest auf ein neutrales Intermediat, in diesem Fall auf Bisabolen übertragen wurde. Die erhöhte Bildung des Protonenakzeptors bei $pH > 8,5$ durch TPS6 wurde dadurch erklärt, dass bei diesen pH-Werten ein gewisser Teil der Hydroxygruppe der Tyrosinseitenkette als Phenolat vorlag und somit nicht mehr als Protonendonator zur Verfügung stand.⁶⁷

4.3 Mechanismus der Produktbildung ausgehend von (2E,6E)-Farnesyldiphosphat (22)

Die Fähigkeit von Terpensynthesen ein weites Spektrum an Produkten aus einer einzigen Ausgangsverbindung zu generieren, ist nicht unbekannt.⁴⁴ Den bisherigen Rekord halten die aus *Abies grandis* isolierte δ -Selinen- und γ -Humulensynthase, die 34

bzw. 52 verschiedene Sesquiterpene generieren.⁵⁵ Als Grund für die Fähigkeit von Sesquiterpensynthasen mehrere unterschiedliche Produkte zu synthetisieren, wird in der starken Instabilität und somit hohen Reaktivität des im elektrophilen Reaktionsmechanismus entstehenden Carbokations vermutet.^{33,63} Ferner wird angenommen, dass das Vorkommen von Multiproduktterpensynthasen eine evolutionäre Anpassung ist, die mit geringem Aufwand an Genetik und enzymatischen Mechanismen ein Maximum an Produkten ermöglicht.¹¹ Ein generelles Schema, das die experimentellen Ergebnisse der Inkubationsexperimente in H₂O und D₂O mit unmarkierten und chiral deuterierten Substraten integriert, ist in Abb. 43 (entspricht Abb. B-1, Beilage) gezeigt. Weiterhin berücksichtigt das mechanistische Konzept die identischen Konfigurationen der Produkte, die gleiche Kohlenstoffgrundgerüste besitzen, sowie die unabhängigen Biosynthesewege, die durch Protonierung neutraler Intermediate initiiert werden. Die Zyklisierungskaskade startet mit der Ionisierung von (2*E*,6*E*)-Farnesyldiphosphat, das in der Konformation **22a** vorgefaltet ist, wodurch ein hochreaktives *transoides* Farnesylykation (**24**) gebildet wird. Aus dem C1-C11-Ringschluss von **24** resultiert das (2*E*,6*E*)-Humul-10-ylkation (**28**), welches durch Abspaltung eines Protons direkt in das achirale α -Humulen (**56**) übergeht (Abb. 43). Der elektrophile Angriff auf die *Re*-Seite der C2-C3-Doppelbindung von **28** mit nachfolgender Deprotonierung liefert (-)-(*E*)- β -Caryophyllen (**53**). Der Hauptteil der Produkte (95 %) entsteht durch eine initiale C1-C10-Zyklisierung, die aus dem elektrophilen Angriff auf die *Si*-Seite der distalen Doppelbindung des Farnesylykations (**24**) resultiert. Dabei wird die (*R*)-Konfiguration am C10 des (2*E*,6*E*)-Germacren-11-ylkations (**27**) etabliert. Diese Konfiguration bringt das C1-H_{*Re*} in eine günstige Position zum leeren *p*-Orbital der Isopropylseitenkette und initiiert den 1,3-Hydrid-Shift, der zum (2*E*,6*E*)-Germacren-1-ylkation (**82**) führt (Abb. 43). Der stereochemische Verlauf der Hydridwanderung ist dabei in Übereinstimmung mit dem 1,3-Hydrid-Shift, der in der Biosynthese von (-)-Germacren D in *Solidago canadensis* identifiziert wurde.¹⁰⁷ In *Streptomyces coelicolor* A3(2) hingegen führt eine veränderte Geometrie des (2*E*,6*E*)-Germacren-1-ylkations (**82**) bei der Bildung von (-)-Germacren D zum Transfer des C1-H_{*Si*} anstatt des C1-H_{*Re*}.¹⁴⁸

In einem alternativen Reaktionsweg wird das C1-H_{*Re*} unter gleichzeitiger Cyclopropanringbildung abgespaltet, wobei das bizyklische (+)-Bicyclogermacren (**61**) in kleinen Mengen freigesetzt wird. Der Großteil von **61** bleibt enzymgebunden und wird durch Reprotonierung an der *Si*-Seite von C3, nachfolgender C6-C2-Zyklisierung

und abschließender Eliminierung eines Protons an C14 in (-)-*allo*-Aromadendren (**57**) überführt. Die hohen Einbauquoten von Deuterium in **57** bei den Markierungsstudien in D₂O konnten zum ersten Mal die wichtige Rolle von **61** als biogenetischen Vorläufer für Sesquiterpene mit einem Dimethylcyclopropanring belegen, die von verschiedenen Autoren postuliert wurde.^{109,149,150}

Ungefähr 91 % der gesamten Reaktionskaskade verläuft über das monozyklische Kation **82**, das einerseits durch Deprotonierung zu (-)-Germacren D (**34**) und andererseits durch Reaktion mit einem Wassermolekül in die Alkohole 4 α -Hydroxygermacra-1(10),5-dien (**68**) und Kunzeaol (**74**) überführt wird (Abb. 43). Wie durch Markierungsexperimente in schwerem Wasser gezeigt wurde, bleibt ein großer Teil von **34** enzymgebunden und durchläuft anschließend eine konformelle Änderung von einer *cisoiden* in eine *transoide* Struktur. Nachfolgende Protonierung an der exozyklischen Methylengruppe liefert das (2*Z*,6*E*)-Germacren-1-ylkation (**33a**), das nach einer C6-C1-Zyklisierung in das Cadinan-7-ylkation (**83a**) übergeht. Dieser Reaktionsweg wurde bereits 1975 von Arigoni⁶⁹ für die Biosynthese von Cadalan-Gerüsten vorgeschlagen und konnte nun erstmals bei der hier untersuchten Sesquiterpensynthese nachgewiesen werden. Der Reaktionspfad bietet eine Alternative zu dem allgemein akzeptierten Biosyntheseweg der über intermediär gebildetes Nerolidyldiphosphat (**25**) verläuft.^{70-72,151} Das Kation **83a** nimmt eine Schlüsselstellung in der Bildung aller Cadalane mit einem *cis*-Decalinringssystem ein, die über 80 % des Produktspektrums von MtTPS5 bilden. Durch einen unspezifischen Verlust eines vicinalen Protons geht **83a** in δ -Cadinen (**65**), γ -Muurolen (**59**) und α -Muurolen (**62**) über, während durch die Reaktion mit einem Wassermolekül Torreyol (**73**) entsteht (Abb. 43). Der Ringschluss zwischen C2 und C7 von **83a** ergibt das trizyklische Copaan-Gerüst, aus dem durch Eliminierung eines Protons entweder α - oder β -Copaen (**51**, **54**), sowie durch Einfang eines Wassermoleküls Copan-3-ol (**67**) gebildet wird. Neben dem C1-C7-überbrückten Decalinringssystem wird ausgehend von **83a** ebenfalls ein 5,6,6-Dreiringssystem durch C3-C7-Zyklisierung geformt. Das daraus resultierende Kation reagiert mit einem Wassermolekül unter der Bildung von Copaborneol (**69**). Ein weiterer Reaktionskanal, der einen 1,2-Hydrid-Shift beinhaltet, transformiert Kation **83a** zu dem Cadinan-6-ylkation (**84**), welches entweder durch Deprotonierung (-)-Cadina-1,4-dien (**66**) oder mit einem Wassermolekül die epimeren Cubenole **70** und **72** ergibt. Ein vergleichbarer 1,2-Hydrid-Shift wurde für die Biosynthese von (+)-*epi*-Cubenol beschrieben, dessen Bildung von zellfreien Extrakten von *Heteroscyphus planus* und einer Terpensynthase

aus *Streptomyces* sp. LL-B7 katalysiert wird.^{70,152} Ein zweiter 1,2-Hydrid-Shift überführt Kation **84** in das Cadinan-1-ylkation (**85**), das nach Eliminierung eines Protons (-)-Cadina-3,5-dien (**55**), *trans*-Cadina-1(6),4-dien (**58**) oder (-)-Bicyclosesquiphellandren (**60**) freisetzt (Abb. 43). Das bityclische Dien **58** kann auch direkt durch Deprotonierung des Kations **84** gebildet werden. Das Hauptprodukt (-)-Cubebol (**64**), sowie (-)- α -Cubeben (**50**) und (-)- β -Cubeben (**52**) entstehen ausgehend von Kation **84** durch eine C2-C6-Zyklisierung mit anschließendem Verlust eines Protons oder der Reaktion mit Wasser.

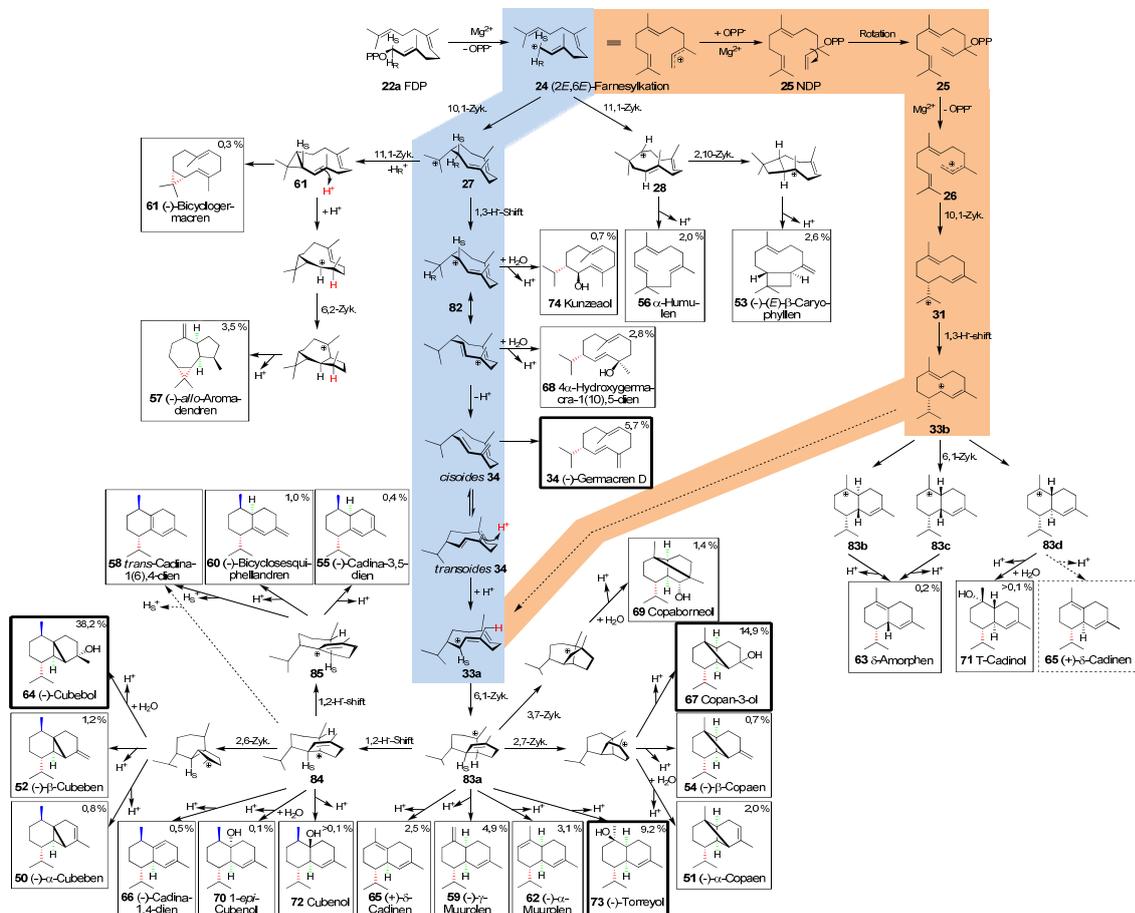


Abb. 43. Hypothetischer Reaktionsmechanismus für die Bildung der Sesquiterpene katalysiert durch MtTPS5. Die Farben rot, blau und grün repräsentieren Stereozentren mit identischen Konfigurationen. Die Bildung des Schlüsselintermediates **33** über die Protonierung von Germacren D (**34**) ist blau, die über Nerolidyldiphosphat (**25**) orange hinterlegt. (Abb. 43 ist in größerer Form als Beilage (Abb. B-1) der Arbeit hinzugefügt.

Cadalan-Sesquiterpene mit einer anderen relativen Konfiguration der Brückenkopf-Kohlenstoffatome C1 und C6 sowie des Kohlenstoffatoms C10 (Kationen **83b-d**) wie δ -Amorphen (**63**) und T-Cadinol (**71**) können anscheinend nicht über die Protonierung des *transoiden* (-)-Germacren D (**34**) gebildet werden, da kein Einbau von Deuterium in die Produkte bei Inkubationsexperimenten in D₂O festgestellt wurde. In diesen Fällen verläuft die Reaktionssequenz zum Kation **33** über das intermediär gebildete tertiäre allylische Nerolidyldiphosphat (**25**) das durch eine Rotation um die neu geformte C2-C3-Einfachbindung eine Isomerisierung der (2*E*)- in die (2*Z*)-Doppelbindung des Substrates **22** erlaubt (Abb. 43, orange). Das stereogene Zentrum der potentiellen Zwischenstufe **25** ist höchstwahrscheinlich (*R*)-konfiguriert, da die Inkubationen mit (*3R*)-d₆-**25** zu zyklischen Produkten führte, wohingegen mit dem optischen Antipoden nur azyklische Produkte erhalten wurden. Die anschließende C10-C1-Zyklisierung etabliert die (*R*)-Konfiguration an C10 des (2*Z*,6*E*)-Germacren-11-ylkations (**31**). Ein stereospezifischer 1,3-Hydrid-Shift des C1-H_{Re} ergibt Kation **33**. Die verschiedenen Konformationen **33a-d** bestimmen die räumliche Orientierung der angulären Wasserstoffatome des bicyklischen Systems, das nach dem elektrophilen Angriff von C1 an die C6-C7-Doppelbindung entsteht. Beide Kationen **83b** und **83c**, bei denen das C1-Wasserstoffatom und die Isopropylgruppe zueinander *trans*-ständig sind, stellen potentielle Vorläufer von δ -Amorphen (**63**) dar, welches durch Deprotonierung freigesetzt wird. Die Bildung von T-Cadinol (**71**) verläuft über den elektrophilen Angriff von C1 auf die *Si*-Seite der C6-C7-Doppelbindung von **33**, woraus eine *trans*-Konfiguration (1*R*,6*S*) (Kation **83d**) der Brückenwasserstoffatome resultiert (Abb. 43). Der Alkohol wird letztendlich durch Reaktion von **83d** mit Wasser gebildet. Markierungsexperimente mit der Y526F-Mutante in D₂O zeigten, dass auch alle anderen Cadalan-Sesquiterpene, wie **62** oder **73**, über den Nerolidyldiphosphat-Weg gebildet werden können. Dies könnte erklären, warum die Deuterierungsgrade der Cadalane beim Wildtypen nie den Wert von 92 %-d₁ überschritten, obwohl 98 %-d₁ wie bei *allo*-Aromadendren (**57**) möglich waren. Daraus lässt sich ableiten, dass 92 % des Schlüsselintermediates **83a** über die Protonierung von *transoiden* (-)-Germacren D (**34**) (Abb. 43, blau) und etwa 8 % über den Nerolidyldiphosphat-Weg (Abb. 43, orange) erhalten werden.

4.4 Enzymatische Kontrolle der Reaktionskanäle

Das Sesquiterpensynthase-Gen *MtTPS5*, das aus *Medicago truncatula* isoliert wurde, kodiert für ein Enzym, das 27 verschiedene Produkte ausgehend von (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) generiert. Die stereochemische Analyse der Produkte zeigt eine Konservierung der Konfigurationen von Verbindungen mit gleichem Kohlenstoffgrundgerüst sowie zwischen strukturell verwandten Substanzen. Dadurch wurde die Vorhersage der Startkonformation des zyklisierenden Substrates im aktiven Zentrum möglich. Es zeigte sich zusätzlich, dass alle analysierten Produkte im Rahmen der Messgenauigkeit optisch rein waren (> 98 % *ee*), was für eine sehr rigide enzymatische Kontrolle der Ringschlussreaktionen spricht. Die erste Zyklisierung zum zehngliedrigen Ringsystems des (2*E*,6*E*)-Germacren-11-ylkations (**27**) resultiert in einem (*R*)-konfigurierten Stereozentrum an C10, das in allen Folgeprodukten der Germacran- und Cadalanreihe wiederzufinden ist (Abb. 43). Eine ähnlich starke stereochemische Kontrolle einer Multiproduktsesquiterpensynthase innerhalb der Reaktionskaskade wurde bei der Bildung der Nebenprodukte der 5-*epi*-Aristolochensynthase aus Tabak berichtet.¹⁵³ Der erste Ringschluss ausgehend vom (2*E*,6*E*)-Farnesylykation (**24**) ist identisch mit dem von *MtTPS5* und führt ebenfalls zum (10*R*)-(2*E*,6*E*)-Germacren-11-ylkation (**27**), dessen Konfiguration an C10 in allen Folgeprodukten wiederzufinden ist. Im Gegensatz dazu, katalysieren die Multiproduktsesquiterpensynthasen (TPS4 und TPS5) aus *Zea mays* und die Trichodien-Synthase aus *Fusarium sporotrichioides* die Bildung von racemischen und diastereomeren Produkten. Die unterschiedlichen Konfigurationen der Stereozentren an C6 und C7 der dabei gebildeten Produkte wird durch das intermediäre Auftreten von sowohl (6*R*)- als auch (6*S*)-Bisabolylykationen erklärt.^{95,154} Die korrekte Faltung des (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) bzw. des Farnesylykations diktiert in diesen Fällen nicht allein die Struktur und Konfiguration der Produkte, wie in der bisherigen Diskussion vorausgesetzt wurde. Das aktive Zentrum von Terpensynthasen scheint groß und flexibel genug zu sein, um konformelle Änderungen und Umlagerungen der kationischen Intermediate zu erlauben, wie u. a. die Bildung des Kations **83a** aus dem Kation **82** im Zuge der von *MtTPS5* katalysierten Bildung von Cadalan-Sesquiterpenen zeigt (Abb. 43). Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit theoretischen Untersuchungen von Zyklisierungsmechanismen verschiedener Sesquiterpene, die vom Bisabolylykation abstammen. Die Studien deuten darauf hin, dass bestimmte produktive Konformationen des Bisabolylykations, die nicht direkt vom Farnesylykation abstammen können, durch konformelle Änderungen zugänglicher Bisabolylykationen gebildet

werden.¹⁵⁵ Neben der Zyklisierung zum makrozyklischen Germacren-11-ylkation (**27**) werden in der Reaktionskaskade von MtTPS5 durch weitere Ringschlüsse komplexere Kohlenstoffgerüste aufgebaut. Dabei sind die C-C-Knüpfungen die zu trizyklischen Systemen führen, durch die Geometrie ihrer bizyklischen Vorläufer prädeterniert. Dahingegen besitzt die Bildung der Decalinringssysteme (Cadalanen) mehr Freiheitsgrade, wie das Auftreten der Diastereomerenpaare (-)- δ -Cadinen (**65**) und δ -Amorphen (**63**) bzw. Torreyol (**73**) und T-Cadinol (**71**) beweist. Aus den relativen Verhältnissen der kationischen Vorläufer dieser Produkte ist ersichtlich, dass das Cadinan-7-ylkation **83a** für 81,6 % der Produkte verantwortlich ist, währenddessen die Kationen **83b-d** nur rund 0,3 % zum Produktspektrum beitragen (Abb. 43). Die große Produktvielfalt von MtTPS5 ist vorwiegend ein Resultat der verminderten Stabilisierung der kationischen Intermediate, wodurch aus fast jeder positiven Zwischenstufe auch ein Enzymprodukt resultiert. Dies wird besonders am Kation **83a** deutlich. Nach dessen Bildung stabilisiert es sich durch eine Vielzahl unabhängiger Reaktionskanäle, wie Hydrid-Shifts, Zyklisierungen, Deprotonierung oder durch Reaktion mit Wasser zu 17 verschiedenen Produkten. Anscheinend übt das Enzym eine weniger starke Kontrolle auf die von **83a** abzweigenden Reaktionswege aus, was aus dem Fehlen an günstig positionierten funktionellen Gruppen der Aminosäureseitenketten resultieren könnte, welche die abschließenden Zyklisierungen und Deprotonierungen hin zu definierten Cadalan-Endprodukten lenken würden.⁵⁷

4.5 Die Rolle des Tyrosin 526 in der Katalyse von MtTPS5

Die durch die 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS) aus *Nicotiana tabacum* katalysierte Umwandlung von (2*E*,6*E*)-Farnesyldiphosphat (**22**) zu 5-*epi*-Aristolochin (**37**) verläuft über das enzymgebundene, stabile Intermediat Germacren A (**36**).⁸⁴ Eine Protonierung an C6 führt zu einem Carbokation, aus welchem über eine Hydridverschiebung und anschließende Zyklisierung das Eudesman- oder Guajangrundgerüst entsteht. Ausgehend von der TEAS-Kristallstruktur vermuteten Starks *et al.*, dass die Hydroxylgruppe von Tyr520 im Zusammenspiel mit den beiden Aspartatseitenketten Asp444 und Asp525 als Protonendonator an der Aktivierung von Germacren A (**36**) mitwirken und eine katalytische Triade bilden.⁸³ Ein Vergleich der TEAS-

Aminosäuresequenz mit der von MtTPS5 zeigte, dass alle drei Aminosäuren in MtTPS5 konserviert waren (Asp450, Tyr526, Asp530). Eine direkte Beteiligung der Aspartatseitenkette von Asp530 konnte aufgrund des dreidimensionalen Strukturmodells von MtTPS5, das auf Basis der Kristallstruktur von TEAS erstellt wurde, ausgeschlossen werden, da der große Abstand zwischen der phenolischen OH-Gruppe des Tyrosins und des Sauerstoffatoms des Aspartats eine Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen verhinderte. Hinweise auf eine Beteiligung von Tyr526 lieferte die computergestützte Modellierung von Enzym-Substrat-Komplexen, die eine Orientierung des C3-Kohlenstoffatoms des Substrats in Richtung der phenolischen OH-Gruppe der Tyrosinseitenkette offenlegte. Der Ersatz der Tyrosin- durch eine Phenylalaninseitenkette im aktiven Zentrum von MtTPS5 (Y526F-Mutante) resultierte in der Bildung von vorwiegend Germacranen (80 % des Produktgemisches) und einer starken Abnahme von Cadalan-Sesquiterpenen im Vergleich zum Wildtyp (82 % WT → 15 % Y526F-Mutante). Die erhöhte Akkumulation der zehngliedrigen makrozyklischen Verbindungen (**34**, **68**, **74**) bekräftigt die Funktion von Germacren D (**34**) als Zwischenstufe in der Biosynthese der Cadalane und unterstützt die Annahme, dass die Hydroxylgruppe von Tyr526 (Y526) bei der Übertragung eines Protons auf die exozyklische Doppelbindung von **34** eine entscheidende Rolle spielt. Weitere Belege lieferten die geringen Einbauraten an Deuterium (0-30 %-d₁) in die Cadalan-Produkte, die durch Inkubationsexperimente in D₂O erhalten wurden. Der Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin unterband die Reprotonierung von **34** jedoch nicht vollständig, da ein merklicher Einbau von Deuterium in Cubebane und Copaane stattfand (11-30 %-d₁). Dies deutet darauf hin, dass Tyr526 nicht als direkter Protonendonator fungiert. Vielmehr ist es wahrscheinlich, dass ein im aktiven Zentrum eingeschlossenes Wassermolekül als erforderliche Lewis-Säure dient. Eine ähnliche Funktion eines Solventmoleküls wurde, für die von der Aristolochensynthese aus *Penicillium roqueforti* katalysierte Reaktion vorgeschlagen.¹⁵⁶ Ein wichtiger Hinweis für die Anwesenheit von Wasser im aktiven Zentrum von MtTPS5 war der hohe Anteil von Sesquiterpenalkoholen, die nahezu 70 % des Produktspektrums von MtTPS5 und 53 % in der Y526F-Mutante darstellten. Die Lewis-Säure-Eigenschaften des Wassermoleküls könnten durch Wasserstoffbrückenbindungen zur phenolischen OH-Gruppe von Tyr526 und anderen polaren Aminosäureseitenketten angepasst werden. Weiterhin verhindert die Verankerung des Wassers über ein solches Netz von polaren Wechselwirkungen das vorzeitige Quenchen der kationischen Zwischenstufen bei der Produktbildung. Zusätzliche könnte das

Solventmolekül als generelle Base dienen, die die Eliminierung eines Protons und somit die Freisetzung der Produkte bewirkt, wie die Röntgenstrukturanalysen von Komplexen der (+)-Bornyldiphosphatsynthase aus *Salvia officinalis* mit dem Produkt sowie mit Stickstoffanaloga der kationischen Intermediate nahelegen.¹⁵⁷ Dass das aus dem Substrat hervorgegangene Diphosphatanion die treibende Kraft für die Reprotonierung neutraler Intermediate sein könnte, geht aus Studien an einer Kristallstruktur der Aristolochensynthase aus *Aspergillus terreus* hervor.⁷⁷ Die starke Kofaktoren-Abhängigkeit der Biosynthese von Macrocarpen, die durch TPS6 und TPS11 aus Mais katalysiert wird, liefert weitere Belege für diese Hypothese.⁶⁷ Ähnlich wie in MtTPS5 ist bei den Macrocarpensynthasen in Gegenwart von Mn^{2+} -Ionen im Gegensatz zu Mg^{2+} -Ionen eine deutliche Abnahme der Protonierungseffektivität zu beobachten, was eine erhöhte Freisetzung von Germacranen (MtTPS5) bzw. β -Bisabolon (TPS6 und TPS11) bedingt.⁶⁷ Die Veränderungen im Produktspektrum könnten auf veränderte Metallkation-Diphosphatanion-Koordinationspolyeder zurückzuführen sein, die aus den unterschiedlichen Ionenradien (Mg^{2+} : 78 pm; Mn^{2+} : 91 pm) und Elektronenkonfigurationen der Außenhülle resultieren. Ohne weitere detailliertere strukturelle Informationen und zusätzliche Experimente kann keine dieser Annahmen ausgeschlossen werden.

Die Tyrosinseitenkette ist ebenfalls an der Protonenübertragung auf das neutrale Intermediat Bicyclogermacren (**61**) beteiligt, wie aus den verringerten Einbauraten an Deuterium, in das von der Y526F-Mutante freigesetzte Folgeprodukt (-)-*allo*-Aromadendren (**57**), hervorgeht (WT: 98 %-d₁; Y526F: 64 %-d₁). Der wesentlich geringere Einfluss von Tyr526 auf die *allo*-Aromadendren-Biosynthese im Vergleich zu den Cadalanen lässt vermuten, dass andere Aminosäuren eine wichtigere Rolle beim Protonentransfer spielen. Bemerkenswerterweise war der Anteil von **61** an den Gesamtprodukten, die vom mutierten Enzym gebildet wurde, mit 12,9 % stark erhöht (WT: 0,3%). Zusätzlich resultierte aus Inkubationen der Y526F-Mutante mit **22** ein vierfach erhöhter Anteil der durch 1,3-Deprotonierung gebildeten Produkte, im Vergleich zu denen, die durch eine 1,3-Hydridverschiebung freigesetzt wurden (Abb. 44). Dies deutet darauf hin, dass durch das Fehlen der phenolischen Hydroxygruppe das Gleichgewicht zwischen den konkurrierenden Reaktionskanälen, die vom (2*E*,6*E*)-Germacren-1-ylkation (**82**) abzweigen, gestört wird (Abb. 44). Eine mögliche Erklärung könnte die Störung des Netzwerkes aus Wasserstoffbrücken sein, wodurch die Base aktiviert wird, die für die Eliminierung des C1-H_{Re} von (2*E*,6*E*)-

Germacren-1-ylkation (**82**) verantwortlich ist. Dies ist aber rein spekulativ, da nichts über die strukturellen Grundlagen die Hydridverschiebungen begünstigen bekannt ist.

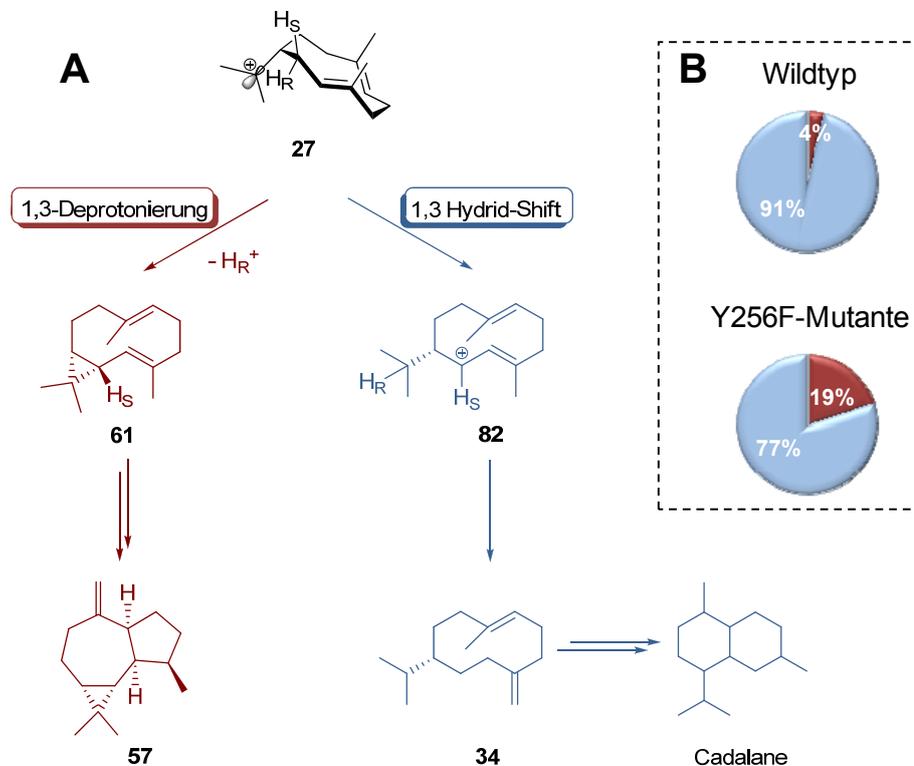


Abb. 44. Einfluss der Tyrosinseitenkette 526 auf Produktverhältnisse der Verbindungen die ausgehend vom Germacren-11-ylkation (27**) gebildet werden. (A) Abzweigende Biosynthesewege vom (2*E*,6*E*)-Germacren-11-ylkation (**27**); (B) Produktanteile der über 1,3-Deprotonierung (rot) oder 1,3-Hydrid-Shift (blau) vom Wildtypen und Y526F-Mutante gebildeten Verbindungen.**

4.6 Mechanismus der MtTPS5-katalysierten Zyklisierungen von (2*Z*,6*E*)-FDP (**76**) – ein „schlafender biosynthetischer Weg“?

Wie die mechanistischen Studien an der von MtTPS5 mit (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) katalysierten Umsetzung zeigten, ist das Enzym in der Lage, Cadalan-Sesquiterpene über zwei verschiedene Wege zu synthetisieren. Dabei ist der Reaktionskanal, der die Isomerisierung des anfänglich gebildeten (2*E*,6*E*)-Farnesylkations (**24**) über NDP (**25**) zum (2*Z*,6*E*)-Farnesylkation (**26**) beinhaltet (Abb. 43, orange), stark unterdrückt. Interessanterweise wurde (2*Z*,6*E*)-FDP (**76**), das präisomerisierte Substratanalogon des Kations **26**, mit gleicher Effektivität wie (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) umgesetzt, wobei aber eine

völlig neue Produktpalette erhalten wurde. Ein großer Anteil der freigesetzten Verbindungen (~33 %) hatte dabei ein Cadalan-Grundgerüst, welches im Gegensatz zu den (2*E*,6*E*)-FDP-Produkten eine entgegengesetzte Absolutkonfiguration (1*S*,6*R*) der Brückenkopfkohlenstoffatome besaß. Dies ist ein weiterer Beleg, dass in MtTPS5 die Cadalanbildung ausgehend von **22** nicht, wie im Allgemeinen angenommen, über die Zwischenstufe des Nerolidyldiphosphates (**25**) bzw. des daraus resultierenden (2*Z*,6*E*)-Farnesylylkations (**26**) verläuft (Abb. 43, orange). In diesem Fall wäre die Freisetzung der (2*E*,6*E*)-FDP-Produkte zu beobachten gewesen, wie es z. B. für die Macrocarpensynthase TPS11 und Multiproduktesquiterpensynthase TPS4 aus Mais gezeigt werden konnte, die in Gegenwart beider Substrate die gleichen Produkte generieren.^{67,80} Aufgrund der Bestimmung der Absolutkonfigurationen eines Teils der Produkte, konnten der stereochemische Verlauf der Reaktionskaskade und die Startkonformation des (*Z*)-isomeren Substrates rekonstruiert werden (Abb. 45). Das hochreaktive (2*Z*,6*E*)-Farnesylykation (**26**), das nach Abspaltung der Diphosphatgruppe von **76** gebildet wird, geht überwiegend (~57 %) durch einen C1-C11-Ringschluss in das (2*Z*,6*E*)-Humul-10-ylkation (**32**) über. Die Verlagerung der positiven Ladung von C10 auf C1 ist nur durch einen direkten 1,3-Hydrid-Shift möglich, da sich zwischen den beiden Positionen ein quartäres Kohlenstoffatom befindet, welches die Möglichkeit zweier konsekutiver 1,2-Hydrid-Shifts ausschließt. Eine Entscheidung, ob das C1-*H_{Re}* oder das C1-*H_{Si}* an der Reaktion beteiligt ist, bedarf weiterer Experimente. Aus dem (2*Z*,6*E*)-Humul-1-ylkation (**105**) wird durch Deprotonierung γ -Humulen (**93**) und durch Reaktion mit Wasser das Hauptprodukt Humulan-6,9-dien-3-ol (**98**) gebildet (Abb. 45). Desweiteren werden aus **105** durch einen elektrophilen Angriff auf die *Si*-Seite der C6-C7-Doppelbindung und anschließender Eliminierung eines Protons bzw. durch Reaktion mit einem Wassermolekül die Himachalane **90**, **94**, **95** und **100** freigesetzt. Ein weiterer Reaktionskanal, der sich vom (2*Z*,6*E*)-Farnesylykation (**26**) ableitet, verläuft über die anfängliche C1-C10-Zyklisierung zum zehngliedrigen makrozyklischen (2*Z*,6*E*)-Germacren-11-ylkation (**31**). In diesem Schritt wird die (*R*)-Konfiguration an C10 etabliert, die in allen Cadalan-Sesquiterpenen konserviert ist. In Übereinstimmung mit dem Reaktionsmechanismus von (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) ist bei (2*Z*,6*E*)-FDP (**76**) ebenfalls eine 1,3-Deprotonierung des C1-*H_{Re}* zu beobachten, wodurch das zu Bicyclogermacren (**61**) ((2*E*,6*E*)-FDP-Produkt) doppelbindungsisomere Isobicyclogermacren (**91**) gebildet wird. Zusätzlich wird das Kation **31** durch eine Hydridwanderung in das (2*Z*,6*E*)-Germacren-1-ylkation (**33**) überführt (Abb. 45). In Analogie zum (*E*)-isomeren Substrat

ist es sehr wahrscheinlich, dass es sich hierbei um einen direkten 1,3-Hydrid-Shift und nicht um zwei konsekutive 1,2-Hydrid-Shifts handelt. Zusätzlich lässt die Absolutkonfiguration an C1 des Isobicyclogermacrens (**91**) vermuten, dass das (2*Z*,6*E*)-Germacren-1-ylkation (**33**) über eine Verschiebung des C1- H_{Re} von C1 zu C11 generiert wird. Diese Annahme muss zukünftig durch Inkubationsexperimente mit chiral deuterierten Substraten ((1*S*)- bzw. (1*R*)-[1-²H]-**76**) verifiziert werden. Im weiteren Reaktionsverlauf ergibt der Ringschluss zwischen C1 und C6 von **33** das Cadinan-7-ylkation (**83c**), das durch Verlust eines Protons in die beiden doppelbindungsisomeren Amorphe **63** und **92** übergeht. Durch eine zusätzliche Zyklisierung von **83c** zwischen C2 und C7 mit anschließender Deprotonierung wird das trizyklische (-)- α -Ylangen (**89**) gebildet (Abb. 45).

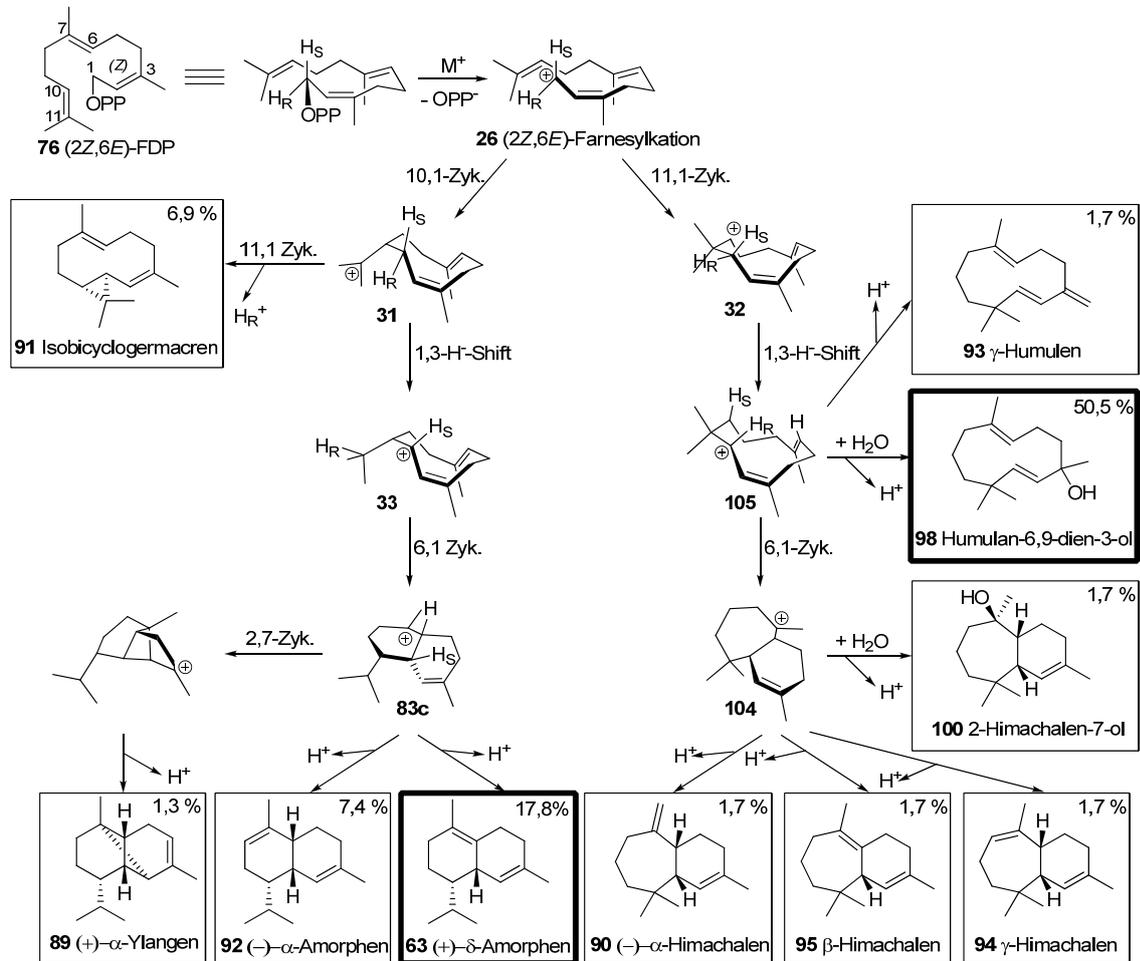


Abb. 45. Hypothetischer Bildungsmechanismus der Produkte, die nach Inkubation von (2*Z*,6*E*)-FDP (**76**) freigesetzt werden. Die Hauptprodukte sind hervorgehoben (schwarze Boxen).

Die mechanistischen Betrachtungen der Produktbildung ausgehend von (2*E*,6*E*)- und (2*Z*,6*E*)-FDP (**22**, **76**) zeigen deutlich, dass eine enge Korrelation zwischen den beiden Reaktionskaskaden besteht (Abb. 46). Die wesentlichen Elemente wie 1,3-Hydrid-Shift, initiale 1,10- bzw. 1,11-Zyklisierung und der Aufbau von Bizyklen durch einen zweiten Ringschluss, sind in beiden Reaktionsmechanismen zu finden, doch führen sie je nach Substrat zu unterschiedlichen diastereomeren Kohlenstoffskeletten (Abb. 46). Dies ist im Wesentlichen auf die unterschiedlichen Startkonformationen der beiden Substrate zurückzuführen, wodurch die reaktiven Molekülteile eine unterschiedliche räumliche Anordnung zueinander einnehmen, was durch die Ergebnisse der Dockingstudien untermauert werden konnte. Beispielsweise sind bei der Bildung des bizyklischen Decalinringsystems die Reaktionszentren an C1 und C6 in den isomeren Substraten **22** und **76** spiegelbildlich zueinander angeordnet, wodurch im Fall des (2*E*)-isomeren Substrates eine (1*R*,6*S*)- und bei dem (2*Z*)-isomeren Substrat eine (1*S*,6*R*)-Konfiguration der Brückenkopfwasserstoffatome des Cadinan-7-ylkations **83** folgt (Abb. 46). Im Gegensatz dazu besitzen die distale Doppelbindung und das kationische Zentrum an C1 beim ersten Ringschluss zwischen C1 und C10 die gleiche Orientierung zueinander, woraus sich in beiden Fällen eine (*R*)-Konfiguration an C10 des entsprechenden makrozyklischen Kations (**27** und **31**) ergibt (Abb. 46). Der große Einfluss der anfänglichen Faltung der Farnesylseitenkette im aktiven Zentrum in Abhängigkeit von der Konfiguration der C2-C3-Doppelbindung konnte bereits für die 5-*epi*-Aristolochensynthase (TEAS) aus Tabak gezeigt werden.¹⁵⁸ Aufgrund von kristallographischen Untersuchungen an Enzym-Substratkomplexen der TEAS mit Fluoranaloga von (2*E*,6*E*)- und (2*Z*,6*E*)-FDP konnte der unterschiedliche stereo- und regiochemische Verlauf der Reaktionskaskaden ähnlich wie bei MtTPS5 auf zwei Startkonformationen zurückgeführt werden.^{158,159} Die biologische Bedeutung des „schlafenden“ Zyklisierungsweges ausgehend von (2*Z*,6*E*)-FDP (**76**) ist bisher nicht geklärt. Die Isolation einer (2*Z*,6*E*)-FDP-Synthase aus *Mycobacterium tuberculosis*, die an der bakteriellen Zellwandbiosynthese beteiligt ist, zeigt die Relevanz von **76** in anderen biologischen Systemen.^{160,161} Außerdem wurde bisher, obwohl häufig beobachtet, der Bildung von kleinen Mengen (2*Z*,6*E*)-FDP (3-14 %) durch (2*E*,6*E*)-FDP-Synthasen keine biologische Bedeutung beigemessen, doch könnte dieser Substratpool dazu beitragen, die zusätzliche biologische Aktivität der Terpensynthasen weiter auszuschöpfen.¹⁶²

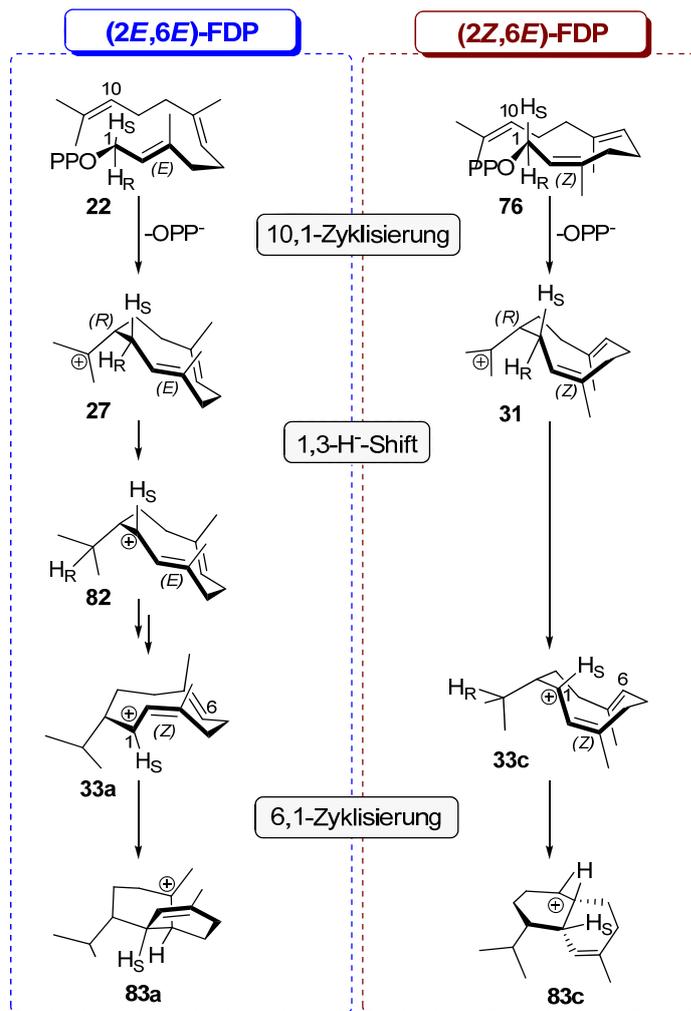


Abb. 46. Vergleich der Biosynthesewege zu den diastereomeren Cadinan-7-ylkationen 83a und 83c ausgehend von (2E,6E)-FDP (22) (blau) und (2Z,6E)-FDP (76) (rot).

4.7 Frühe Stufen in der Cadalanbildung

Wie unter Abschnitt 4.3 beschrieben, verläuft der Reaktionsweg ausgehend von (2E,6E)-FDP (22) zu den Cadalan-Sesquiterpenen hauptsächlich über die Protonierung des Germacren D (34) (Abb. 47, Weg A). Die Synthese umgeht die geometrische Restriktion, die eine direkte Bildung der Cadalane aus dem (2E)-isomeren Substrat verhindert, in geringerem Maße auch über einen alternativen Weg. Dies belegten die stark reduzierten Deuteriumeinbauraten der von der Y526F-Mutante freigesetzten Produkte. Ein Reaktionskanal der Cadalanbildung bei dem kein Protonentransfer nötig ist, beinhaltet die Zwischenstufe Nerolidyldiphosphat (25) (Abb. 47, Weg B). Die Isomerisierung vom (2E,6E)- zum (2Z,6E)-Farnesylykation (24, 26) wird dabei über die

Drehung der C2-C3-Einfachbindung des tertiären allylischen Intermediates **25** realisiert. Diese vorgelagerte Isomerisierung wurde als essentieller Bestandteil der Biosynthesewege einer großen Bandbreite strukturell unterschiedlicher Verbindungen identifiziert, wie z. B. bei β -Macrocarypen⁶⁷, Amorpha-4,11-dien¹⁶³, Trichodien¹⁶⁴, Isocedrol¹⁴⁴ und *epi*-Isozizzaen¹⁶⁵. Um zu überprüfen, ob MtTPS5 die Fähigkeit zur Isomerisierung der Doppelbindung besitzt, wurde die Enzymaktivität in Gegenwart der enantiomeren Nerolidyldiphosphate ((3*S*)- und (3*R*)-d₆-**25**) getestet.

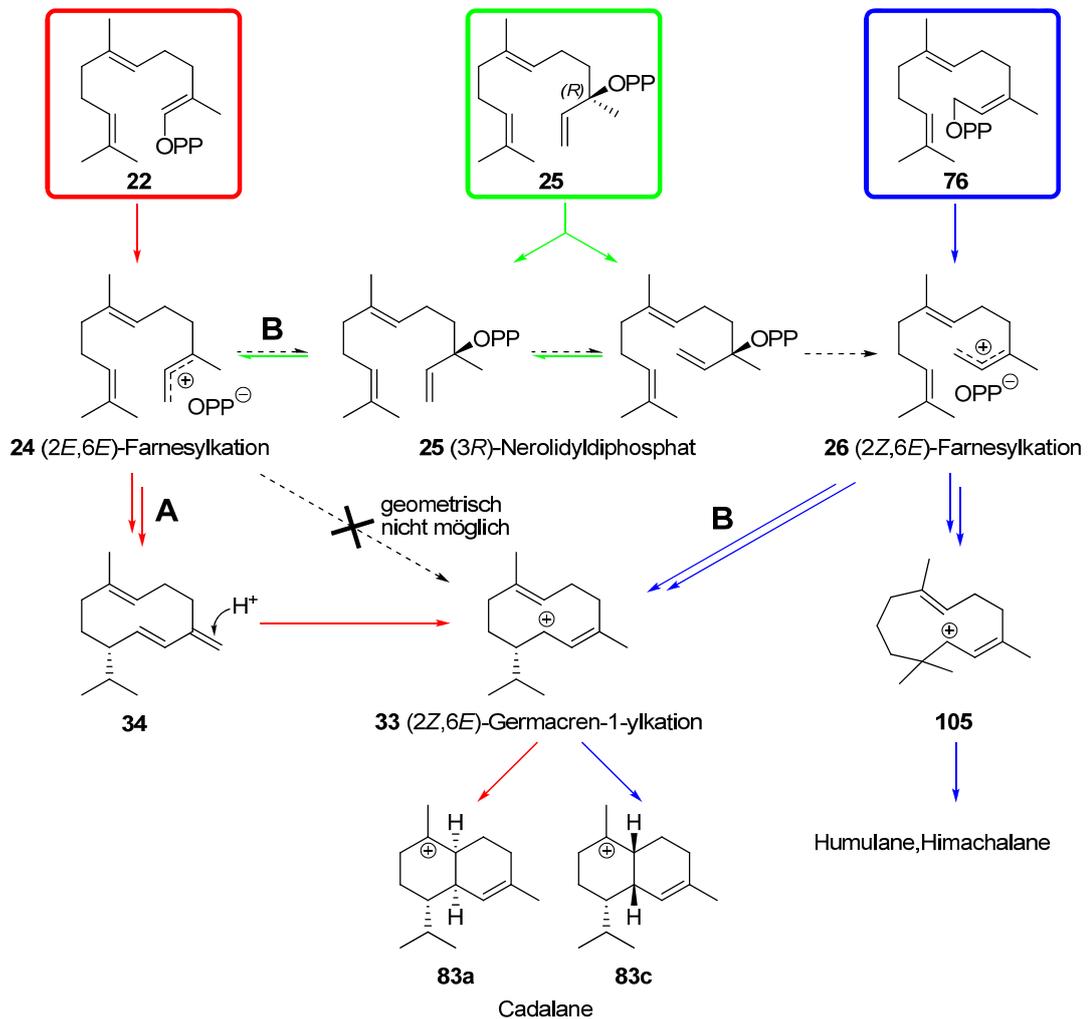


Abb. 47. Mögliche Bildungswege (A, B) des (2*Z*,6*E*)-Germacren-1-ylkations (33), der universellen Vorstufe der Cadalane. Zusätzlich sind die entsprechenden artifiziellen Substrate der Zwischenstufen dargestellt und deren Reaktionswege farblich markiert.

Aus den Umsetzungen mit (3*S*)-NDP ((3*S*)-**25**), bei denen nur azyklische Farnesene (**87**, **88**) freigesetzt werden, kann man schließen, dass dieses Enantiomer keine relevante Zwischenstufe im Reaktionsmechanismus von MtTPS5 darstellt. Demgegenüber wird durch Inkubation der Synthase mit (3*R*)-d₆-NDP ((3*R*)-d₆-**25**) ein zu (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) vergleichbares Produktprofil beobachtet. Offensichtlich wird das tertiäre allylische Diphosphat in das *transoide* Farnesylykation (**24**) umgewandelt. Die hohen Markierungsgrade der Cadalan-Sesquiterpene, die aus (3*R*)-d₆-**25** in Anwesenheit von D₂O gebildet werden, untermauern die Annahme, dass der Reaktionsweg über **24** und die Protonierung von Germacren D (**34**) beschränkt wird (Abb. 47, grün). Die geringen Mengen an Humulan-6,9-dien-3-ol (**98**) (ca. 3 % des Gesamtproduktes), dem Hauptprodukt der Umsetzungen mit (2*Z*,6*E*)-FDP (**76**), im Produktspektrum von (3*R*)-d₆-**25**, deuten darauf hin, dass ein kleiner Teil des (*R*)-konfigurierten Substrates zum *cisoiden* Kation **26** umgewandelt wird. Ein weiterer Hinweis, dass MtTPS5 nicht bzw. nur in sehr geringem Maße in der Lage ist, das (2*E*,6*E*)-Farnesylykation (**24**) zu isomerisieren, zeigen die Ergebnisse der Umsetzung mit (2*Z*,6*E*)-FDP (**76**), dem Analogon zum Kation **26**. Bei den Inkubationsexperimenten mit **76** werden strukturell ähnliche, aber hinsichtlich der Konfiguration der Stereozentren unterschiedliche Substanzen im Vergleich zu (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) gebildet (Abb. 47, blau). Die Biosynthese der Produkte, insbesondere der Cadalane, verläuft in diesem Fall nicht über einen Protonentransfer sondern über direkte Zyklisierung des präisomerisierten Substrates, wie durch die Bildung von nicht markierten Produkten in Gegenwart von D₂O belegt wurde. Doch sind, wie in Abschnitt 4.6 diskutiert, die wesentlichen Elemente der von (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) ausgehenden Reaktionskaskade ebenfalls in der Katalyse des artifiziellen Substrats **76** wiederzufinden. Einzig die Inhibierung der Isomerisierungsreaktion verhindert die Bildung der (2*Z*,6*E*)-FDP-Produkte. Im Prinzip ist es aber möglich, dass durch strukturelle Veränderungen des Proteins dieser „schlafende“ Biosyntheseweg aktiviert wird. In verschiedenen Mutagenesestudien wurde gezeigt, dass die Veränderungen einzelner Aminosäuren einen dramatischen Einfluss auf die Isomerisierungsaktivität ausüben können. So konnten die unterschiedlichen Produktverhältnisse von Farnesen und Bergamoten, die von TPS10-Allelen aus verschiedenen Maislinien generiert werden, auf den Austausch einer hydrophoben Aminosäureseitenkette zurückgeführt werden.¹⁶⁶ In einer weiteren Maissynthese (TPS4) bewirkte die Änderung einer Tyrosinseitenkette in einen Phenylalanin-, Serin- oder Leucinaminosäurerest den kompletten Verlust der

Enzymaktivität bezüglich $(2E,6E)$ -FDP (**22**).⁸⁰ Im Gegensatz dazu, bildeten die drei Tyrosinmutanten in Gegenwart von $(2Z,6E)$ -FDP (**76**) das ursprüngliche Produktprofil, woraus auf eine essentielle Rolle der aromatischen Seitenkette für die Isomerisierung von $(2E,6E)$ -FDP (**22**) geschlossen wurde.⁸⁰ In äquivalenter Position ist in der Aminosäuresequenz von MtTPS5 ebenfalls ein Tyrosin-Rest (Y526) zu finden, der wegen seiner wichtigen Funktion bei der Protonenübertragungsreaktion genauer untersucht wurde. Jedoch setzten sowohl die Y526F Mutante als auch der MtTPS5-Wildtyp in Anwesenheit von $(2Z,6E)$ -FDP (**76**) die gleichen Produkte frei, die sich nur in ihren relativen Verhältnissen zueinander unterscheiden (Daten nicht gezeigt). Dies legt nahe, dass in MtTPS5 Y526 keinen Einfluss auf die Isomerisierung des $(2E,6E)$ - zu dem $(2Z,6E)$ -Farnesylykation (**24**, **26**) hat.

5 Zusammenfassung

Medicago truncatula produziert wie die meisten Pflanzen eine Vielzahl unterschiedlicher flüchtiger Terpene. Die qualitativen und quantitativen Zusammensetzungen der von Sesquiterpenen dominierten Gemische sind dabei für die jeweiligen auslösenden abiotischen und biotischen Faktoren spezifisch. Insgesamt waren zu Beginn dieser Arbeit sechs Gene aus *M. truncatula* bekannt (*MtTPS1-MtTPS6*), die Sequenzhomologien zu Terpensynthasen zeigten. Da die Funktionen der Proteine, für die diese Gene kodieren, nicht bekannt war, sollten diese funktionell charakterisiert werden, um unter anderem deren Beteiligung an den komplexen Duftprofilen zu evaluieren. Der Schwerpunkt der Arbeit lag in der Aufklärung der zugrundeliegenden Reaktionsmechanismen, die von den einzelnen Terpensynthasen katalysiert werden. Neben dem exakten stereochemischen Verlauf der Reaktionskaskaden und der ausgeübten enzymatischen Kontrolle über die Reaktionswege standen die strukturellen Grundlagen der Enzymkatalyse im Blickpunkt dieser Arbeit.

Drei der insgesamt sechs bekannten pflanzlichen Terpensynthasegene konnten in *E. coli* heterolog exprimiert und über einen angehängten N-terminalen His-tag aufgereinigt werden. Die Charakterisierung der rekombinanten Proteine hinsichtlich Produkt- und Substratspezifität ergab, dass es sich bei MtTPS1 und MtTPS5 um Sesquiterpensynthasen handelte. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen der Sequenzanalyse von MtTPS1 und MtTPS5, bei der keine N-terminalen Signalpeptide erkannt wurden. Daraus ergibt sich eine für Sesquiterpensynthasen typische zytoplasmische Lokalisation. Während es sich bei MtTPS1 um ein hochspezifisches Enzym handelte, das nur (-)-(E)- β -Caryophyllen (92 %) und α -Humulen (8 %) bildete, katalysierte MtTPS5, ausgehend von (2E,6E)-Farnesyldiphosphat, die Bildung einer großen Anzahl strukturell unterschiedlicher Produkte. Im Gegensatz zu MtTPS1, scheint MtTPS5 nur zu einem geringen Teil zum Duftstoffspektrum beizutragen, das in Reaktion auf den Befehl von *Spodoptera littoralis* freigesetzt wird. MtTPS3 war in der Lage sowohl Geranyl- (C₁₀), Farnesyl- (C₁₅) als auch Geranylgeranyldiphosphat (C₂₀) in die entsprechenden tertiären allylischen (3S)-Alkohole umzuwandeln, wobei die Umsetzung des C₁₅-Substrats am effektivsten verlief. Aufgrund der Akzeptanz einer großen Bandbreite von Substraten, ist eine Zuordnung der Funktion von MtTPS3 hinsichtlich der Duftstoffbiosynthese *in planta* schwierig. Die N-terminale Transitsequenz deutet darauf hin, dass MtTPS3 in

den Plastiden aktiv ist und dort unter anderem an der Bildung des Homoterpens TMTT beteiligt ist. Um die genaue Funktion der identifizierten Terpensynthasen in der Pflanze zu bestimmen, sind weiterführende Experimente nötig.

Die Umsetzung des rekombinanten Enzyms MtTPS5 mit dem natürlichen Substrat (2*E*,6*E*)-Farnesyldiphosphat führte zu 27 verschiedenen Sesquiterpenen, die überwiegend ein 3,7-Dimethyl-10-isopropyloctalingrundgerüst (Cadalan-Grundgerüst) besaßen. Durch Markierungsexperimente unter Verwendung von schwerem Wasser konnte die Hypothese von Arigoni bestätigt werden, die einen Biosyntheseweg für Verbindungen mit einer (*Z*)-konfigurierten C2-C3-Doppelbindung (z. B. Cadalane) beinhaltet.⁶⁹ Der Schlüsselschritt auf dem Weg zu Cadalan-Grundgerüsten ist die Protonenübertragung auf das neutrale, enzymgebundene Intermediat Germacren D, die im Rahmen dieser Arbeit erstmals nachgewiesen werden konnte. Dieser Bildungsweg stellt eine Alternative zu dem gemeinhin akzeptierten und gut untersuchten Reaktionsweg über die FDP-NDP-Isomerisierung dar. Einzelheiten über die strukturellen Grundlagen des Protonierungsprozesses konnten durch *in vitro*-Mutagenese einer Aminosäure im aktiven Zentrum von MtTPS5 erlangt werden. Der Austausch von Tyrosin gegen Phenylalanin in Position 526 führte zu einer tiefgreifenden Änderung des Produktspektrums von MtTPS5, in dem, wie sich zeigte, die Protonierung von Germacren D verhindert wurde. Diese Ergebnisse unterstreichen die Wichtigkeit von Protonenübertragungsreaktionen in der Biosynthese von Sesquiterpenen und geben weitere Einblicke, wie diese Reaktionen die evolutionäre Flexibilität der Terpensynthasen vergrößern.

Neben der Protonen-initiierten Bildung des (2*Z*,6*E*)-Germacren-1-ylkations ist MtTPS5 in der Lage, Cadalan-Sesquiterpene über die Zwischenstufe Nerolidyldiphosphat zu generieren, die eine Isomerisierung von (2*E*,6*E*)-Farnesyldiphosphat erlaubt. Ein Vergleich der Produktprofile, die nach Inkubation mit den beiden enantiomeren Nerolidyldiphosphaten und dem präisomerisierten (2*Z*,6*E*)-FDP erhalten wurden, lässt den Schluss zu, dass die Fähigkeit von MtTPS5 zur vorgelagerten Isomerisierung sehr gering ausgeprägt ist. So lieferte die Umsetzung mit (2*Z*,6*E*)-FDP im Vergleich zum natürlichen Substrat Produkte mit teils komplett anderen Kohlenstoffgerüsten, obwohl die gleichen Reaktionsschritte wie Zyklisierung und 1,3-Hydrid-Shifts für den Aufbau der Produkte verwendet wurden. Dockingexperimente lassen vermuten, dass die

unterschiedlichen Startkonformationen der beiden doppelbindungsisomeren Substrate die verschiedenen Produktspezifitäten bedingen.

Durch die Analyse des stereochemischen Verlaufs der (2*E*,6*E*)-FDP-Reaktionskaskade mit chiral deuterierten Farnesyldiphosphaten und der Bestimmung der Absolutkonfiguration der Enzymprodukte konnten Informationen über die enzymatische Kontrolle und den zeitlichen Ablauf der Reaktionsschritte erhalten werden. Die Bildung optisch reiner Produkte wird durch die stringente enzymatische Kontrolle der am Aufbau von Stereozentren beteiligten Ringschlüsse und Hydridverschiebungen erreicht. Im Gegensatz dazu ist die Kontrolle der finalen Reaktionsschritte, die zur Freisetzung der Produkte führen, limitiert. Dies wird aus der Bildung von Doppelbindungsisomeren und epimeren Alkoholen ersichtlich. Durch retrosynthetische Überlegungen, basierend auf der stereochemischen Information über die Enzymprodukte, konnte die Absolutkonfigurationen der Stereozentren auf eine Startkonformation des zyklisierenden Substrates zurückgeführt werden.

6 Experimenteller Teil

6.1 DNA- und Proteintechniken

6.1.1 Herstellung und Reinigung rekombinanter Terpensynthasen

Die entsprechenden Gene der Terpensynthasen wurden in den Vektor pHIS8-3⁹⁹ mit N-terminalem His-tag kloniert und in *E. coli* BL21(DE3) exprimiert. Dazu wurden 1 l LB-Medium mit 5 ml Übernachtskultur überimpft und bei 37 °C und 220 U min⁻¹ im Schüttelinkubator bis zu einer OD₆₀₀ von etwa 0,5 kultiviert. Anschließend wurde die Expression mit IPTG (Endkonzentration 1 mM) induziert. Nach Induktion über Nacht bei 18 °C wurde die Zellsuspension durch Zentrifugieren (6000 g, 30 min, 2 °C) sedimentiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Das Pellet wurde in Lysepuffer resuspendiert (3 ml pro g Pellet) und mit Lysozym (1 mg ml⁻¹) bei 4 °C für 1 h inkubiert. Durch Ultraschallbehandlung (2x 5 min, 50 % Leistung, Bandelin UW2070, BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin) erfolgte der Zellaufschluss, an den sich eine Sedimentation (10000 g, 1 h, 2 °C) der unlöslichen Zellbestandteile anschloss. Der Überstand wurde auf eine mit 1,5 ml Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) gefüllte und mit 12 ml eiskaltem Lysepuffer equilibrierte Säule aufgegeben. Zum Waschen wurde die Säule zweimal mit 6 ml eiskaltem Waschpuffer gespült. Die Elution des an die Ni-NTA-Matrix gebundenen Proteins erfolgte durch Zugabe von 8 ml eiskaltem Elutionspuffer (1 ml Fraktionen). Fraktionen mit Enzymaktivität (siehe Abschnitt 6.1.7) und hohem Zielproteingehalt wurden vereinigt und mit Hilfe einer NAPTM-25 Säule (GE Healthcare, Freiburg) in den Lagerpuffer umpuffered, um die Stabilität der Enzyme bei der Lagerung zu erhöhen. Die gesamten Reinigungsschritte wurden mittels SDS-Page (siehe Abschnitt 6.1.4) kontrolliert. Die Extrakte wurden auf 1 mg ml⁻¹ Protein verdünnt und konnten bei -20 °C mehrere Monate ohne nennenswerten Aktivitätsverlust gelagert werden.

LB-Medium:	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl in 1 l Wasser, kurz vor Verwendung mit Kanamycin (50 µg ml ⁻¹) versetzt.
Lysepuffer:	50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH = 8,0.
Waschpuffer:	wie Lysepuffer, nur mit 20 mM Imidazol.
Elutionspuffer:	wie Lysepuffer, nur mit 250 mM Imidazol.
Lagerpuffer:	50 mM TRIS-HCl, 10 mM NaCl, 10 % Glycerol (m/m) pH = 7,5.

6.1.2 Herstellung von hochreinem Protein für die Enzymcharakterisierung

Die Terpensynthese wurde wie unter Abschnitt 6.1.1 beschrieben in *E. coli* exprimiert und aus dem Bakterienrohextrakt über den His-tag aufgereinigt. Die Fraktionierung der Proteine im aufkonzentrierten Extrakt ($\sim 5 \text{ mg ml}^{-1}$, 1 ml Injektionsvolumen) erfolgte durch Gelfiltration (Äkta Explorer, GE Healthcare, Uppsala, Schweden) unter Verwendung einer Superdex 200 pg Säule (GE Healthcare, Freiburg). Die Fraktionen mit Enzymaktivität (siehe Abschnitt 6.1.7.1) wurden vereinigt, über Vivaspin 20 Zentrifugalkonzentratoren (MWCO 30000 Da; Sartorius Stedim Biotech, Göttingen) aufkonzentriert und über eine NAPTM-10 Säule (GE Healthcare, Freiburg) in den Lagerpuffer (siehe Abschnitt 6.1.1) umgepuffert (Endkonzentration 1 mg ml^{-1}). Die Reinigungsschritte wurden mittels SDS-Page kontrolliert (siehe Abschnitt 6.1.4).

Elutionspuffer: 50 mM TRIS-HCl, 150 mM NaCl, pH 7,4.

Fluss: 1 ml min^{-1} .

Fraktionsvolumen: 500 μl .

6.1.3 Proteinquantifizierung nach Bradford

Die Proteinquantifizierung erfolgte nach einer modifizierten Methode von Bradford *et al.* in Mikrotiterplatten.¹⁶⁷ Ein Probenvolumen von 20 μl wurde mit 200 μl Proteinfärbereagenz 5 min inkubiert und anschließend bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch mit einem Mikrotiterplattenspektrometer (SPECTRAMax 250, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) vermessen. Hochkonzentrierte Proteinlösungen wurden mit Wasser verdünnt. Die Berechnung der Proteinmenge erfolgte anhand einer BSA-Kalibrationsgerade.

Färbereagenz 0,08 mg ml^{-1} Coomassie Brilliant Blue G250, 5 % Ethanol absolut (v/v), 8,5 % H_3PO_4 (v/v).

6.1.4 SDS-Polyacrylamidelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteinproben wurden für die Denaturierung mit 3x Ladepuffer und Dithiothreitol (DTT, Endkonzentration 20 mM) versetzt und bei 95 °C im Heizblock erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in Anlehnung an eine Methode von Lämmli *et al.* mit einem 4 %igen Sammelgel und einem 10 %igen Trenngel.¹⁶⁸ Zuerst wurden die Proteinproben

bei einer Spannung von 100 V im Sammelgel fokussiert und dann bei einer konstanten Spannung von 200 V aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteine durch zweistündige Behandlung mit Coomassie-Farbstofflösung gefärbt. Eine Entfärbung der Gele wurde mit heißem deionisiertem Wasser über Nacht erreicht, welche dann zur weiteren Aufbewahrung getrocknet wurden.

3x Ladepuffer	3 ml Glycerin, 0,9 g SDS, 3 mg Bromthymolblau, 3,75 ml 4x Sammelgelpuffer mit Wasser auf 10 ml auffüllen.
Laufpuffer:	25 mM TRIS-HCl, 200 mM Glycin, 1 % SDS (m/m), pH = 8,8.
Sammelgel:	4 % Acrylamid / Bisacrylamid (29:1, von Roth), 40 mM SDS, 50 mM TRIS-HCl pH = 6,8, 0,01 % TEMED (v/v), 0,1 % APS (m/m).
Trenngel:	10 % Acrylamid / Bisacrylamid (29:1, von Roth), 40 mM SDS, 150 mM TRIS-HCl pH = 9,1, 0,01 % TEMED (v/v), 0,1 % APS (m/m).
Coomassie-Lösung:	0,1 % Coomassie Brilliant Blue 250 (m/m), 40 % Methanol (v/v), 7 % Essigsäure (v/v).

6.1.5 Bestimmung des Molgewichts von Terpensynthasen

Die Terpensynthase MtTPS5 wurde wie unter Abschnitt 6.1.1 beschrieben in *E. coli* exprimiert und aus dem Rohextrakt über eine Äffinitätschromatographie aufgereinigt. Die vereinigten Fraktionen mit dem Zielprotein wurden aufkonzentriert ($\sim 5 \text{ mg ml}^{-1}$) und anschließend mittels Gelfiltration aufgetrennt (Äkta Explorer, GE Healthcare, Freiburg). Die Detektion der Proteine erfolgte bei zwei unterschiedlichen UV-Wellenlängen (260 nm, 280 nm). Die aufgefangenen Fraktionen wurden auf ihre Aktivität hin überprüft (siehe Abschnitt 6.1.7). Die Bestimmung des Molekulargewichtes erfolgte durch den Vergleich der Retentionszeiten von MtTPS5 mit denen verschiedener Standards (Thyroglobulin, 669 kDa; Ferritin, 440 kDa; Aldolase, 158 kDa; Rinderserumalbumin, 67 kDa; Ovalbumin, 43 kDa; Chymotrypsinogen A, 25 kDa; Ribonuklease A, 13,7 kDa; Sigma Aldrich (München) oder Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden))

Säule:	Superdex 200 HR 10/30, (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden).
--------	---

Elutionspuffer: 100 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, pH = 7,4.

Fluss: 0,3 ml min⁻¹.

6.1.6 Site directed Mutagenesis (Tobias Köllner)

Die Konstruktion der Y526F Mutante von MtTPS5 erfolgte mit dem „QuickChange[®] SiteDirected Mutagenesis Kit“ (Stratagen, La Jolla, CA, USA) gemäß den Angaben des Herstellers. Das PCR-basierte Mutageneseprotokoll wurde mit der in den pHIS8-3 Vektor klonierten cDNA von MtTPS5 unter Verwendung von Primern durchgeführt, welche die gewünschte Mutation tragen (Y526Ffwd GTTTTATGGATGTTATTTTCAAAAACAAAGATAAC, Y526Frev GTTATCTTTGTTTTTGAATAACATCCATAAAAC). Die Konstrukte der Mutante wurden vor der Expression komplett sequenziert (Eurofins MWG Operon, Ebersberg).

6.1.7 Aktivitätsbestimmung von rekombinanten Terpensynthasen

6.1.7.1 Mikroassay

Falls nicht anders erwähnt, wurde zur Aktivitätsbestimmung von in *E. coli* heterolog exprimierten Terpensynthasen das His-tag gereinigte Enzym (600 nM) in Assaypuffer mit (2*E*)-GDP (**21**), (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) oder (2*E*,6*E*,10*E*)-GGDP (**23**) (Endkonzentration 50 μM) für eine Stunde bei 30 °C inkubiert (Assayvolumen 250 μl). Die Reaktion erfolgte dabei in 1,5 ml GC-Vials mit PTFE-beschichteten Naturkautschukdichtscheiben (Macherey Nagel, Düren). Zur Isolierung der Reaktionsprodukte aus der Gasphase wurde eine SPME-Faser (PDMS-100, Polydimethylsiloxan, Supelco, Bellafonte, PA, USA) verwendet. Die Reaktionslösung wurde alternativ mit 150 μl Pentan, das 1 ng μl⁻¹ Dodecan als internen Standard enthielt, überschichtet und 90 min bei 30 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch heftiges Schütteln (20 s, Vortex-Genie[®] 2, Bohemia, NY, USA) gestoppt und zur Phasentrennung zentrifugiert (4000 g, 30 s, 4 °C). Anschließend wurde das Zweiphasengemisch in flüssigem Stickstoff eingefroren, die wieder aufgetaute organische Phase mit einer Pasteurpipette entfernt und wie unter Abschnitt 6.2.4 beschrieben, analysiert.

Assaypuffer I: 25 mM HEPES, pH = 7,5, 10 % Glycerol (m/m), 10 mM MgCl₂,
1 mM DTT.

6.1.7.2 Makroassays

Zur Strukturaufklärung von Copan-3-ol (**67**) und Humulan-6,9-dien-3-ol (**98**) wurden zu 10 ml Assaypuffer I partiell aufgereinigtes Protein (600 nM) und (2*E*,6*E*)- bzw. (2*Z*,6*E*)-FDP (**22**, **76**) (50 μM) zugegeben. Die Reaktionsmischungen wurden mit 10 ml Pentan überschichtet und über Nacht bei 30 °C inkubiert. Nach Beendigung der Reaktion wurde heftig geschüttelt (1 min, Vortex-Genie® 2, Bohemia, NY, USA) und die Phasen durch Zentrifugation (4000 g, 5 min, 4 °C) voneinander getrennt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 5 ml Pentan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und auf ein Volumen von 1 ml eingengt. Die Auftrennung der Reaktionsprodukte sowie weitere Umsetzungen sind im Abschnitt 6.2.3 beschrieben.

6.1.7.3 Bestimmung der K_m-Werte

Die Bestimmung der Gesamtenzymaktivität erfolgte mit Tritium-markiertem [1-³H]- (2*E*,6*E*)-FDP (37 GBq mol⁻¹, American Radiolabeled Chemicals, St. Louis, MO, USA). Das Reaktionsvolumen betrug hierbei 100 μl und enthielt His-tag gereinigtes Enzym (600 nM) und je nach Experiment verschiedene Konzentrationen der Substratlösung bzw. der Kofaktoren in Assaypuffer II. Die Lösung wurde mit 1 ml Pentan überschichtet und 10 min bei 30 °C inkubiert. Nach Beendigung der Umsetzung durch heftiges Schütteln (20 s, Vortex-Genie® 2, Bohemia, NY, USA) wurden 500 μl der organischen Phase abgenommen und mit 4 ml Lipoluma Szintillationscocktail (Packard Bioscience, Groningen, Niederlande) gemischt. Die Radioaktivität wurde im Szintillationszähler (Packard Tricarb 2300TR) vermessen. Zur Ermittlung des K_m-Werts für (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) wurden 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 5, 10, 20 bzw. 40 μM Substratlösung in Gegenwart von 600 nM MtTPS5 und 10 mM MgCl₂ wie oben beschrieben inkubiert und analysiert. Für die Bestimmung der K_m-Werte in Gegenwart von zweiwertigen Metallionen wurden die Konzentrationen von Mg²⁺ (0,1, 0,5, 1, 5, 10 bzw. 50 mM) und Mn²⁺ (0,01, 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 5 bzw. 10 mM) variiert und die Konzentration der Substratlösung bei 5 μM konstant gehalten. Alle Assays wurden

vierfach ausgeführt, um statistische Fehler zu minimieren. Die K_m -Werte wurden mit Hilfe des Sigma Plot Enzym Kinetik Modul 1.3 (Systat Software GmbH, Erkrath) berechnet.

Assaypuffer II: 10 mM MOPSO, 10 % Glycerol (m/m) pH = 7,5.

Substratlösung: 100 μM (2*E*,6*E*)-FDP und 0,5 μM [$1\text{-}^3\text{H}$](2*E*,6*E*)-FDP in Assaypuffer II.

6.1.7.4 Bestimmung der pH-Abhängigkeit der Enzymaktivität

Das pH-Optimum wurde mit folgenden Puffern ermittelt: pH 5,0 und 5,5: Acetatpuffer, pH 6,0: MOPS-Puffer, pH 6,5 bis 9,5: TRIS-Puffer, pH 10 bis 11: CAPS-Puffer (alle 20 mM, 10 % Glycerol [m/m]). Dabei wurde wie unter Abschnitt 6.1.7.3 beschrieben vorgegangen, wobei die Substratkonzentration 5 μM (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) und die Konzentration der Mg^{2+} -Ionen 10 mM betrug. Für die Bestimmung der Produktverhältnisse wurde unter den Bedingungen des Mikroassays gearbeitet (siehe Abschnitt 6.1.7.1). Assaypuffer I wurde dabei durch die oben genannten Puffer ersetzt. Die Pentanextrakte der Produkte wurden mittels GC-MS analysiert (siehe 6.2.4.1).

6.1.7.5 Bestimmung der Enzymaktivität in Gegenwart verschiedener Kofaktoren

Die Bestimmung der Gesamtzymaktivität erfolgte mit [$1\text{-}^3\text{H}$]-FDP wie unter 6.1.7.3 beschrieben. Die Kofaktoren wurden in Form der entsprechenden Metallchloride in zwei verschiedenen Konzentrationen (0,1 mM und 10 mM) getestet. Die Produktspezifität in Gegenwart von Mg^{2+} -Ionen (10 mM) und Mn^{2+} -Ionen (0,5 mM) wurde unter Mikroassay-Bedingungen ermittelt (siehe Abschnitt 6.1.7.1). Die Identifizierung und Analyse der mit Pentan extrahierten Produkte erfolgte mittels GC-MS und GC-FID (siehe Abschnitt 6.2.4).

6.1.7.6 Markierungsexperimente mit D_2O

Zur Untersuchung von Protonenübertragungsreaktionen wurden 50 μl des partiell aufgereinigten Enzyms durch Lyophilisation (Maxi-Dry-Lyo, Heto-Holten, Dänemark) das Wasser entzogen. Der Rückstand wurde in 50 μl D_2O (Deutero GmbH, Kastellaun) gelöst. Um einen möglichst vollständigen H-D-Austausch zu gewährleisten, wurde das

in D₂O aufgenommene Enzym vor dem Einsatz im Mikroassay (siehe Abschnitt 6.1.7.1) 30 min auf Eis inkubiert. Die Assayprodukte wurden an einer SPME-Faser absorbiert und mittels GC-MS (Abschnitt 6.2.1) analysiert. Der Markierungsgrad der Produkte wurde ausgehend von den Peakflächen in den Ionenspuren der entsprechenden Molekülonen ([M]⁺, [M+1]⁺) berechnet. Dabei wurden die Flächen (Area) der [M+1]⁺-Ionen hinsichtlich der ¹³C-Satelliten der [M]⁺-Ionen korrigiert (Gleichung 1).

$$\text{Gleichung 1: } d_1 = \frac{\text{Area}([M + 1]^+) - 0,165 \cdot \text{Area}([M]^+)}{\text{Area}([M]^+) + \text{Area}([M + 1]^+) - 0,165 \cdot \text{Area}([M]^+)} \cdot 100 \%$$

Für Sesquiterpenalkohole wurde bei der Analyse, aufgrund ihres sehr schwachen Molekülions auf die [M-H₂O]⁺- bzw. [M-H₂O+1]⁺-Fragmente zurückgegriffen.

6.2 Techniken zu Terpenisolierung und -analyse

6.2.1 Terpenidentifizierung

Zur Identifizierung der Terpene wurden die Massenspektren der einzelnen, mittels GC-MS getrennten Verbindungen mit Referenzspektren aus den Massenspektrenbibliotheken verglichen. Dabei kamen folgende Programme und Bibliotheken zum Einsatz: „MassFinder 3.5“ mit der Massenspektrenbibliothek „Terpenoids and related constituents of essential Oils“ (W.A. König, D.H. Hochmuth, D. Joulain, Universität Hamburg), sowie die Datenauswertungssoftware der Firma Finnigan mit den Massenspektrenbibliotheken „NIST05“ und „Adams Library“.¹⁶⁹ Die eindeutige Identifizierung der Terpene erfolgte über den Vergleich der Retentionsindizes (RI) mit authentischen Referenzproben (siehe Anhang). Dazu wurde die Probe der betreffenden Substanz mit einem Alkanstandard (C₈-C₂₀, Fluka) versetzt und mittels GC-MS analysiert. Die Berechnung der Retentionsindizes erfolgte mit der nachstehenden Formel (Gleichung 2)¹⁷⁰:

$$\text{Gleichung 2: } RI(x) = 100P_z + 100 \left(\frac{\log(Rt(x)) - \log(Rt(P_z))}{\log(Rt(P_{z+1})) - \log(Rt(P_z))} \right)$$

P_z Anzahl der Kohlenstoffatome des zuerst eluierenden Alkans

Rt(P_z) Retentionszeit des zuerst eluierenden Alkans

Rt(x) Retentionszeit der Substanz x

Rt(P_{z+1}) Retentionszeit des später eluierenden Alkans

6.2.2 Gewinnung von Referenzsubstanzen

6.2.2.1 Säurekatalysierte Umlagerung von α -Cubeben (50)

Zur Herstellung von Referenzsubstanzen für die Identifizierung und stereochemische Analyse von Sesquiterpenen wurde α -Cubeben (**50**) durch eine modifizierte Methode von Ohta *et al.* säurekatalysiert umgelagert.¹⁷¹ Dabei wurden 10 mg (\pm)-**50** (Fluka) mit 800 μ l Dioxan und 200 μ l 0,1 M HCl versetzt. Nach Reaktion bei 50 °C für 2 h wurde das abgekühlte Reaktionsgemisch zweimal mit je 1 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden mit Hilfe einer kleinen Na₂SO₄-Säule (Pasteurpipette) getrocknet und per GC-MS analysiert.

6.2.2.2 Säurekatalysierte Umlagerung von Germacren D (34)

Zur Herstellung von Referenzsubstanzen für die Identifizierung und stereochemische Analyse von Sesquiterpenen wurde Germacren D (**34**) durch eine modifizierte Methode von Bülow *et al.* säurekatalysiert umgelagert.¹⁷² Dazu wurden je 5 μ g (+)-, (-)- bzw. (\pm)-**34** in 200 μ l CH₂Cl₂ gelöst, mit einigen Kristallen *p*-Toluensulfonsäure Monohydrat versetzt und 1 h bei Zimmertemperatur gerührt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 300 μ l gesättigter NaHCO₃ gestoppt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 200 μ l Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und mittels GC-MS analysiert.

6.2.2.3 Gewinnung von Referenzsubstanzen aus *Preissia quadrata*¹⁷³

Das Pflanzenmaterial vom Lebermoos *Preissia quadrata* wurde von H. J. Zündorf (Herbarium Haussknecht, Friedrich-Schiller-Universität, Jena) in der Nähe von Thalbürgel (Thüringen) gesammelt. Zur Extraktion wurden 4 g frisches Pflanzenmaterial in einem Mörser mit flüssigem Stickstoff eingefroren, pulverisiert und dreimal mit je 10 ml Pentan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden zur Entfernung fester Bestandteile zentrifugiert (3000 g, 10 min) und das Lösungsmittel mit einem leichten Argonstrom entfernt. Der Rohextrakt wurde über eine kleine Silicasäule (1 g Silicagel, Pentan:Diethylether 4:1 [v/v]) partiell gereinigt und fraktioniert.

6.2.2.4 Bestimmung des Drehwertes von Torreyol (73)

Da keine Informationen über die absolute Konfiguration des aus *Cortinarius odorifer* Britz isolierten Torreyols (73)¹⁷⁴ (bereitgestellt von S. Egli, Birmensdorf, Schweiz) vorlag, wurde der optische Drehwert des Sesquiterpenalkohols mit einem Jasco P-1030 Polarimeter (Labor und Datentechnik GmbH Deutschland, Groß-Umstadt) bestimmt. Der spezifische Drehwert von $[\alpha]_D = +100,6^\circ$ ($c = 0,9$, CHCl_3) zeigt, dass es sich um das entgegengesetzte Enantiomer des von Borg-Karlson *et. al.* beschriebenen Alkohols handelt.¹⁷⁵

6.2.3 Identifizierung von Terpengrundgerüsten

6.2.3.1 Selektive Anreicherung von Enzymprodukten

Zur Identifizierung der Terpengrundgerüste unbekannter Verbindungen (Copan-3-ol (67), Humulan-6,9-dien-3-ol (98)), sowie zur Bestimmung der absoluten Konfiguration von 67 und Cubebol (64) wurden Extrakte aus je zwei Makroassays (siehe Abschnitt 6.1.7.2) vereinigt und auf $\sim 100 \mu\text{l}$ eingengt. Die Trennung der Alkohole von den übrigen Enzymprodukten erfolgte säulenchromatographisch an 1 g Silicagel (Pasteurpipette) unter Verwendung eines Pentan-Diethylether-Gemisches (6:1, [v/v]). Die Fraktionen mit den gewünschten Produkten wurden vereinigt und auf ein Volumen von ungefähr 1 ml unter einem leichten Argonstrom reduziert.

6.2.3.2 Säurekatalysierte Dehydratisierung und Umlagerung

Aus der Probe mit $\sim 500 \text{ ng}$ (GC) gereinigtem Sesquiterpenalkohol (siehe Abschnitt 6.2.3.1) wurde das Lösungsmittel unter einem leichten Argonstrom entfernt. Der Rückstand wurde in $200 \mu\text{l}$ trockenem CH_2Cl_2 aufgenommen und mit $5 \mu\text{l}$ Trifluoressigsäureanhydrid (derivatization grade, Fluka) versetzt. Die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Lösung mit 1 ml Pentan verdünnt und die Reaktion durch sofortige Zugabe von 10 %-iger NaHCO_3 -Lösung gestoppt. Die wässrige Phase wurde zweimal mit je 1 ml Pentan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über eine kleine Na_2SO_4 -Säule getrocknet und auf $\sim 100 \mu\text{l}$ eingengt. Die Analyse der Proben erfolgte per GC-MS.

6.2.3.3 Katalytische Hydrierung

Zur katalytischen Hydrierung wurde die Lösung des jeweiligen Sesquiterpenalkohols (siehe Abschnitt 6.2.3.1) unter einem Argonstrom bis zur Trockene eingeeengt. Der Rückstand wurde in 300 μl Pentan aufgenommen und mit einer Spatelspitze Katalysator (5 % Rhodium auf Aluminium) versetzt. Der Gasraum des Reaktionsgefäßes wurde 10 s mit H_2 gespült und die Reaktionsmischung weitere 15 min unter H_2 -Atmosphäre (1 atm) gerührt. Die Suspension wurde anschließend über Baumwolle filtriert, und die festen Bestandteile mit 500 μl Pentan gespült. Das Volumen wurde auf ~ 200 μl reduziert und die Probe per GC-MS analysiert.

6.2.4 Terpenanalyse

6.2.4.1 GC-MS Methoden

Die gaschromatographische Trennung, Identifizierung und Analyse der Terpengemische wurde mit dem TRACE GC 2000 und angekoppeltem TRACE MS (ThermoQuest/Finnigan, Bremen) durchgeführt. Als achirale Säule wurde eine ZB5-ms Kapillarsäule (0,25 mm i.d. x 15 m x 0,25 μm Film, Phenomenex, Torrance, USA) mit Helium als Trägergas (1,5 ml min^{-1}) verwendet. Die Injektion der Probe (1 μl) erfolgte in der Regel im „splitless-mode“ bei einer Injektortemperatur von 220 $^{\circ}\text{C}$. Alternativ erfolgte die Probenaufgabe direkt über eine SPME-Faser (100 μm Polydimethylsiloxan, SUPELCO, Bellafonte, PA, USA). Die Ofentemperatur betrug anfänglich 50 $^{\circ}\text{C}$ (2 min konstant) und wurde dann mit einer Rate von 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ auf 240 $^{\circ}\text{C}$ und anschließend mit einer Rate von 30 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ auf 280 $^{\circ}\text{C}$ (2 min konstant) erwärmt. Das Ionisierungspotential des Massenspektrometers betrug 70 eV und der Scanbereich lag zwischen 40-250 amu. Trennungen an chiraler stationärer Phase wurden entweder mit einer Heptakis-(2,3-di-*O*-methyl-*O*-*t*-butyldimethyl-silyl)- β -cyclodextrin Säule (50 % in OV1701, m/m; FS-HYDRODEX β -6TBDM; 0,25 mm i.d. x 25 m x 0,25 μm Film, Macherey-Nagel, Düren) oder einer Heptakis-(2,3,6-tri-*O*-methyl)- β -cyclodextrin Säule (50 % in OV1701, m/m; FS-HYDRODEX β -PM; 0,25 mm i.d. x 25 m x 0,25 μm Film, Macherey-Nagel, Düren) mit einem Trägergasfluss von 1 ml min^{-1} (Helium) durchgeführt. Die Temperaturprofile für die Enantiomerentrennung wurden je nach Substanz variiert (Methode I-III):

Methode I: 60 °C (5 min) - 2 °C min⁻¹ - 160 °C - 30 °C min⁻¹ - 200 °C (2 min), FS-HYDRODEX β-6TBDM; (MtTPS5 Enzymprodukte).

Methode II: 60 °C (5 min) - 1 °C min⁻¹ - 160 °C - 30 °C min⁻¹ - 200 °C (2 min), FS-HYDRODEX β-6TBDM (α-Copaen (**51**)).

Methode III: 110 °C (15 min) - 2 °C min⁻¹ - 160 °C - 30 °C min⁻¹ - 200 °C (2 min), FS-HYDRODEX PM (Torreyol (**73**)).

Zur stereochemischen Analyse der MtTPS3-Enzymprodukte wurde ein Fisons 8060 Gaschromatograph (Finnigan, San Jose, CA, USA) mit angekoppelten Quadrupolmassenspektrometer (Fisons MD-800) verwendet. Als Trägergas kam Helium (5 Pis) zum Einsatz. Das Ionisierungspotential betrug 70 eV und der Scanbereich 45-400 amu. Die Trennung der Enantiomeren erfolgte durch eine Heptakis-(2,6-di-*O*-methyl-3-*O*-pentyl)-β-cyclodextrin Säule (HYDRODEX β-3P; 25 m x 0,25 mm x 0,25 μm Film, Machery Nagel, Düren). Dazu wurden 1 μl Probe im „splitless-mode“ bei einer Injektortemperatur von 230 °C injiziert und mit folgenden Temperaturprogrammen aufgetrennt:

Methode IV: 50 °C (1 min) – 2 °C min⁻¹ - 120 °C - 50 °C min⁻¹ - 200 °C (2 min) (Linalool (**46**)).

Methode V: 50 °C (1 min) - 2,3 °C min⁻¹ - 160 °C (10 min) - 15 °C min⁻¹ - 200 °C (2 min) (Nerolidol (**48**)).

Methode VI: 140 °C - 1 °C min⁻¹ - 200 °C (2 min) (Geranyllinalool (**49**)).

Die Quantifizierung der Produkte von MtTPS3 erfolgte durch Aufnahme der entsprechenden Kalibrationsgeraden mit verschiedenen Konzentrationen an Linalool, Nerolidol und Geranyllinalool (alle Fluka) unter den oben beschriebenen GC-MS-Bedingungen.

6.2.4.2 Quantifizierung der Terpene mittels GC-FID

Für die Quantifizierung wurden die Enzymprodukte zunächst auf einem Hewlett-Packard Gaschromatographen Modell 6890 (Palo Alto, CA, USA) unter den oben beschriebenen Bedingungen (siehe Abschnitt 6.2.4.1, H₂ als Trägergas, 1,5 ml min⁻¹, Injektionsvolumen 2 μl) getrennt und mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) (Detektortemperatur 250 °C) analysiert. Die Korrektur der verschiedenen Responsfaktoren von Sesquiterpenkohlenwasserstoffen und -alkoholen erfolgte durch

die Aufnahme von Kalibrationsgeraden, die durch Injektionen verschiedener Konzentrationen an *allo*-Aromadendren (**57**) (Fluka) und Torreyol (**73**) erhalten wurden. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Produktverhältnisse wurden durch vier unabhängige Proben ermittelt, wobei die Summe der identifizierten Verbindungen auf 100 % gesetzt wurde.

6.3 Computergestützte Proteinstrukturanalysen

Das dreidimensionale Strukturmodell wurde unter Verwendung von YASARA¹⁷⁶ automatisch erstellt, wobei wie folgt vorgegangen wurde:

- (i) Suche nach geeigneten Templaten mittels BLASTp.¹¹⁶
- (ii) Erstellung von Alignments.
- (iii) Modellerstellung.
- (iv) Optimierung einzelner Bereiche durch Loop- und Aminosäureseitenkettenmodellierung.

Als geeignete Grundlage für die Modellerstellung wurde die W273S Mutante der 5-*epi*-Aristolochensynthase (PDB-Code: 1HXA) ausgewählt. Die Qualität der fertigen Modelle wurde mit PROCHECK¹¹⁷ und PROSA II¹¹⁸ validiert und die Besten einer weiteren Verfeinerung mit dem YASARA-Makro „MD-Refinement“ unterworfen. Pro Startmodell lieferte das YASARA-Makro zwanzig verschiedene Modelle mit leicht gedrehtem oder verschobenem Proteinerückgrat. Diese wurden abermals mit PROCHECK und PROSA II ausgewertet und das beste Modell ausgewählt. Die Dockingexperimente wurden mit dem Programm PLANTS¹¹⁹ durchgeführt, wobei die Konformationen ausgewählter Seitenketten der zuvor optimierten Struktur geändert wurden, um eine möglichst gute Wechselwirkung mit dem Liganden zu erzielen. Als beweglich wurden die Seitenkette von Y526 aufgrund der vermuteten katalytischen Bedeutung sowie die von R269, W278 und Y532 aufgrund ihrer Größe und Lage im aktiven Zentrum gewählt. Der Ligand und die Aminosäureseitenketten wurden positioniert, die einzelnen Konformationen und Dockingordnungen gespeichert und nach einem Score geordnet. Für jedes Docking wurden in dieser Arbeit 30 Konformationen und Dockingordnungen ausgegeben, die anschließend betrachtet und bewertet wurden. Die Visualisierung der Modelle erfolgte mit dem Programm „VMD-Visual Molecular Dynamics“ (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>).¹²⁰

6.4 Synthesen

6.4.1 Geräte und Chemikalien

6.4.1.1 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Alle NMR Spektren wurden bei 298 K mit einem Bruker Avance DRX 500 oder Bruker AV 400 aufgenommen. Die chemische Verschiebung δ wird in ppm, die Kopplungskonstante J in Hz angegeben. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm relativ zu TMS ($\equiv 0$ ppm) angegeben. Die Festlegung des Nullpunkts erfolge auf Grund der Signale der Lösungsmittel, die als interne Bezugspunkte dienten. Bei der Messung von Diphosphaten wurden die Signale von CD_3OD (3 % in D_2O [v/v]) als Referenzpunkt genutzt, das den Proben vorher zugesetzt wurde.

CDCl_3 : $\delta = 7,26$ ppm (^1H -NMR); $\delta = 77,00$ ppm (^{13}C -NMR)

CD_3OD : $\delta = 3,31$ ppm (^1H -NMR); $\delta = 49,05$ ppm (^{13}C -NMR)

6.4.1.2 Massenspektrometrie

GC-MS(EI)-Spektren wurden mit einer Ionisierungsenergie von 70 eV mit einem ThermoQuest Finnigan Trace GC-MS 2000 (Quadrupol) aufgenommen, das mit einer Phenomenex ZB5-ms -Säule (15 m \times 0,25 mm, 0,25 μm Film) war. Hochauflösende Massenspektren (HR-MS) wurden mit einem Micromass MassSpec gekoppelt mit einem HP6890 Gaschromatographen (GC-Säule: J&W Scientific DB5 30 m \times 0,25 mm, 0,25 μm Film) aufgenommen.

6.4.1.3 Fourier-Transform-Infrarotspektroskopie (FTIR)

Alle IR-Spektren wurden mit einem Bruker EQUINOX 55 FTIR-Spektrometer aufgenommen. Für feste Proben wurden KBr-Presslinge verwendet, flüssige Proben wurden als Film auf KBr-Platten gemessen (32 Scans/Spektrum, 4 cm^{-1} Auflösung, Scanbereich 4000-400 cm^{-1}).

6.4.1.4 Analytische und präparative Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden DC-Aluminiumfolien Kieselgel 60 F₂₅₄ der Firma Merck verwendet. Die präparative Dünnschichtchromatographie zur Reinigung der Diphosphate wurde mit Partisil PK6F Fertigplatten (20 \times 20 cm, Silicagel 60 Å, Fluoreszenzindikator) mit 1 mm Schichtdicke der Firma Whatman durchgeführt.

6.4.1.5 Säulenchromatographie

Zur Säulenchromatographie wurde Kieselgel von ICN (Silica 60-62, 60 Å) verwendet. Die jeweiligen Eluenten werden bei den Durchführungen mit angegeben.

6.4.1.6 Lösungsmittel und Reagenzien

Für die Synthesen wurden käufliche trockene Lösungsmittel verwendet. Petrolether, Essigester und Diethylether wurden vor der Verwendung destilliert. Vor luft- bzw. feuchtigkeitsempfindlichen Reaktionen wurden Kolben im Hochvakuum mit einem Heißluftfön ausgeheizt. Argon wurde als Schutzgas verwendet. Chemikalien und Enzyme wurden bei Sigma-Aldrich erworben, sofern nicht anders angegeben.

6.4.2 Herstellung von Diphosphaten

Die Einführung der Diphosphatgruppe erfolgte nach einer modifizierten Methode von Cramer und Böhm.¹⁰⁵ In einem 4 ml Polypropylenröhrchen wurden 0,20 mmol Terpenalkohol vorgelegt und in 500 µl Trichloracetonitril gelöst. Nach Zugabe von 500 µl einer frisch hergestellten Triethylammoniumphosphat-Lösung (TEAP-Lösung) wurde 5 min bei 37 °C gerührt, wobei sich der anfänglich gebildete Niederschlag auflöste. Anschließend wurden noch je zweimal 500 µl TEAP-Lösung zugegeben und 5 min bei 37 °C inkubiert. Das gesamte Reaktionsgemisch wurde auf eine präparative Dünnschichtplatte aufgebracht und mit einem Laufmittelgemisch aus *i*-Propanol: konz. NH₄OH:H₂O 6:3:1 (v/v/v) über Nacht entwickelt. Die DC-Platte wurde am nächsten Tag an der Luft getrocknet bis kein Ammoniakgeruch mehr wahrnehmbar war. Die Detektion der Reaktionsprodukte erfolgte durch Besprühen mit destilliertem Wasser. Dabei erschienen die Diphosphate als schwache weiße Banden (ca. 6-9 cm von der Auftraglinie entfernt). Diese wurden abgeschabt und zweimal mit je 20 ml 10 mM NH₄HCO₃-Lösung (pH = 8) extrahiert. Die festen Bestandteile wurden durch Zentrifugation (10 min, 3000 g) abgetrennt und der vereinigte Überstand lyophilisiert. Die Prenyldiphosphate wurden als farblose Feststoffe in Form der Trisammoniumsalze erhalten.

Lösung A: 5 ml konz. H₃PO₄ Lösung + 19 ml Acetonitril.

Lösung B: 11 ml NEt₃ + 10 ml Acetonitril.

TEAP-Lösung: 0,91 ml Lösung A + 1,5 ml Lösung B.

6.4.3 (2E,6E)- und (2Z,6E)-3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecantriensäureethyl-ester (77)

In einem 50 ml Kolben wurden unter Argon 15 ml trockener Ethylenglykoldimethylether (DME) und 300 mg NaH (12 mmol) vorgelegt, 2,70 g Triethylphosphonoacetat (12 mmol) unter Rühren zugetropft und anschließend auf 0 °C abgekühlt. Nach 2 h wurden langsam 10 mmol Geranylaceton zugegeben, auf Raumtemperatur erwärmt und über Nacht gerührt. Anschließend wurde die Reaktionslösung 30 min unter Rückfluss zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 20 ml 10 %-iger Na₂CO₃-Lösung. Die organische Phase wurde dreimal mit je 10 ml gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und anschließend das Lösungsmittel im Vakuum entfernt. Das Rohprodukt wurde säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether-Ether 50:1 [v/v]) gereinigt, wobei die beiden Doppelbindungsisomere als farblose Öle erhalten wurden.

Ausbeute: (2E,6E)-77 1,9 g (58 %)
(2Z,6E)-77 0,5 g (15 %)

E-Isomer:

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5,66 (s, 1H), 5,08 (m, 2H), 4,10 (q, *J* = 7,1 Hz, 2H), 2,16 (s, 7H), 2,06 (m, 2H), 1,98 (m, 2H), 1,68 (s, 3H), 1,60 (s, 6H), 1,27 (t, *J* = 7,1 Hz, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 166,9, 159,8, 136,1, 131,4, 124,2, 122,9, 115,6, 59,4, 40,9, 39,6, 26,6, 25,9, 25,7, 18,8, 17,7, 16,0, 14,3 ppm.

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) 264([M]⁺ (2)), 219(5), 203(3), 191(3), 175(3), 147(5), 136(10), 128(39), 121(24), 107(8), 100(13), 95(9), 81(28), 69(100), 55(7).

HR-MS: 64,2088 (C₁₇H₂₈O₂, calc. 264,2089).

IR (Film): ν: 2977, 2917, 1717, 1648, 1446, 1376, 1238, 1211, 1156, 1096, 1060, 985, 865 cm⁻¹.

Z-Isomer:

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 5,65 (s, 1H), 5,16 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 5,09 (m, 1H), 4,14 (q, $J = 7,1$ Hz, 2H), 2,64 (m, 2H), 2,17 (m, 2H), 2,05 (m, 2H), 1,99 (m, 2H), 1,89 (s, 3H), 1,67 (s, 3H), 1,61 (s, 3H), 1,60 (s, 3H), 1,26 (t, $J = 7,1$ Hz, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ 166,3, 160,1, 135,7, 131,3, 124,3, 123,5, 116,2, 59,4, 39,68, 33,4, 26,7 (2C), 25,7, 25,3, 17,7, 16,0, 14,3 ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) 264($[\text{M}]^+$ (9)), 221(16), 191(4), 175(10), 149(36), 137(18), 128(44), 121(57), 109(42), 100(16), 81(38), 69(100), 55(12).

HR-MS: 264,2090 ($\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_2$, calc. 264,2089).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ 2977, 2927, 2856, 1717, 1649, 1446, 1382, 1367, 1351, 1273, 1222, 1143, 1096, 1058, 865 cm^{-1} .

6.4.4 [1,1- $^2\text{H}_2$]-(*2E,6E*)-Farnesol ([1,1- $^2\text{H}_2$]-78)

Zu einer Lösung aus 520 mg (*2E,6E*)-77 (2 mmol) in 25 ml trockenem THF wurden bei 0 °C unter Argon 100 mg Lithiumdeuterid (2,4 mmol) zugegeben. Nach zweistündigem Rühren bei 0 °C wurde die Reaktionsmischung zuerst mit 20 ml Diethylether verdünnt und anschließend 20 ml gesättigte Natrium-Kalium-Tartrat-Lösung zugetropft. Das Zweiphasengemisch wurde separiert und die wässrige Phase dreimal mit je 10 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeengt. Nach der chromatographischen Reinigung an Kieselgel (Petrolether:Diethylether 3:2 [v/v]) erhielt man ein farbloses Öl.

Ausbeute: 321 mg (73 %)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 5,41 (s, 1H), 5,09 (m, 2H), 2,16-1,93 (m, 8H), 1,68 (s, 6H), 1,60 (s, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ 140,0, 135,4, 131,3, 124,3, 123,8, 123,2, 58,71, 39,7, 39,5, 26,7 (2C), 26,3, 25,7, 17,7, 16,3 ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) 224($[\text{M}]^+$ (0,4)), 206(1), 191(4), 181(2), 163(4), 136(13), 121(11), 109(12), 95(20), 81(32), 69(100), 55(8).

HR-MS: 224,2120 ($C_{15}H_{24}^2H_2O$, calc. 224,2109).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ 3328, 2966, 2917, 2197, 2090, 1666, 1447, 1377, 1138, 1081, 955, 888, 833 cm^{-1} .

6.4.5 [1,1- 2H_2]- $(2E,6E)$ -Farnesyldiphosphat ([1,1- 2H_2]-**22**)

Auf dem gleichen Weg wie unter Abschnitt 6.4.2 beschrieben, wurden 44 mg [1,1- 2H_2]- $(2E,6E)$ -Farnesol ([1,1- 2H_2]-**78**) (0,20 mmol) phosphoryliert.

Ausbeute: 52 mg (61 %)

1H -NMR (500 MHz, D_2O): δ 5,40 (s, 1H), 5,15 (m, 2H), 2,17-2,03 (m, 6H), 1,97 (m, 2H), 1,64 (s, 6H), 1,57 (s, 6H) ppm.

^{13}C -NMR (126 MHz, D_2O): δ 143,7, 137,6, 134,5, 125,5, 125,3, 120,9, 39,9, 39,8, 26,8, 26,7, 25,8, 18,0, 16,7, 16,2 ppm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ 3174, 1669, 1561, 1401, 1117, 991, 916, 715, 619 cm^{-1} .

6.4.6 $(2E,6E)$ -Farnesal (**80**)¹⁰²

In 10 ml trockenem CH_2Cl_2 wurden 200 mg $(2E,6E)$ -Farnesol (**78**) (0,9 mmol) unter Argon gelöst, 1,6 g MnO_2 (85 %, 5 micron, Aldrich) zugegeben und über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde über Silicagel filtriert (Diethylether) und säulenchromatographisch an Kieselgel (Petrolether:Diethylether 2:1 [v/v]) gereinigt. Man erhielt ein farbloses Öl.

Ausbeute: 168 mg (85 %)

1H -NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ 9,99 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 5,88 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 5,08 (m, 2H), 2,27-2,18 (m, 4H), 2,17 (s, 3H), 2,09-2,02 (m, 2H), 2,00-1,95 (m, 2H), 1,67 (s, 3H), 1,61 (s, 3H), 1,59 (s, 3H) ppm.

^{13}C -NMR (126 MHz, $CDCl_3$) δ 191,8, 163,9, 136,6, 136,5, 131,5, 131,5, 127,4, 124,1, 124,0, 122,4, 40,6, 39,6, 26,6, 25,7, 25,6, 17,7, 17,6, 16,0 ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) 205($[M]^+$ (2)), 191(1), 177(3), 149(3), 136(10), 121(8), 107(7), 93(10), 84(60), 81(21), 69(100), 55(10).

HR-MS: 220,1833 ($C_{15}H_{24}O$, calc. 220,1827).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ 3326, 2967, 2928, 1713, 1673, 1446, 1382, 1220, 1140, 867, 680 cm^{-1} .

6.4.7 [1-²H]-(2E,6E)-Farnesal ([1-²H]-80)¹⁰³

Auf dem gleichen Weg wie für Farnesal (**80**) beschrieben, wurden 267 mg [1,1-²H₂]-*(2E,6E)*-Farnesol ([1,1-²H₂]-**78**) (1,2 mmol) oxidiert.

Ausbeute: 174 mg (66 %)

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 5,88 (s, 1H), 5,08 (m, 1H), 2,27-2,18 (m, 4H), 2,17 (s, 3H), 2,09-2,02 (m, 2H), 2,00-1,95 (m, 2H), 1,68 (s, 3H), 1,61 (s, 3H), 1,60 (s, 3H) ppm.

¹³C-NMR (126 MHz, CDCl₃): δ 190,9 (t, $J = 26,5$ Hz, 1C), 163,9, 136,6, 131,5, 127,4, 124,1, 122,4, 40,6, 39,6, 26,6, 25,7, 25,6, 17,7, 17,6, 16,0 ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) 206($[M]^+$ (2)), 178(3), 160(2), 150(3), 136(12), 121(7), 107(6), 93(10), 85(74), 81(17), 69(100), 55(8).

HR-MS: 221,1897 ($C_{15}H_{23}^2HO$, calc. 221,1890).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ 2966, 2918, 2856, 2094, 1664, 1444, 1382, 1189, 1153, 1109, 985, 985, 897, 834, 808 cm^{-1} .

6.4.8 [1-²H]-Cyclohex-2-en-1-ol (**81**)¹⁰³

Zu einer Lösung von 500 mg 2-Cyclohexen-1-on (5,2 mmol) in 50 ml trockenem THF wurden bei 0 °C langsam 262 mg LiAlD₄ (6,24 mmol) zugegeben und 2 h bei Raumtemperatur unter Argon gerührt. Die Reaktionsmischung wurde mit 50 ml Diethylether verdünnt und mit 50 ml gesättigter Natrium-Kalium-Tartrat-Lösung versetzt. Die wässrige Phase wurde dreimal mit je 50 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt. Das Rohprodukt wurde per Flash-Kieselgel-

chromatographie aufgereinigt (Petrolether: Diethylether 3:2 [v/v]), wobei man ein farbloses Öl erhielt.

Ausbeute: 354 mg (71 %)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 5,83 (dt, $J = 10,0, 3,6$ Hz, 1H), 5,75 (d, $J = 10,0$ Hz, 1H), 1,92-2,08 (m, 2H), 1,82-1,90 (m, 1H), 1,69-1,78 (m, 1H), 1,54-1,65 (m, 2H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ 130,7, 129,7, 31,9, 25,1, 18,9.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) 99($[\text{M}]^+$ (48)), 98(49), 84(13), 83(58), 80(17), 78(7), 69(23), 58(16), 56(20), 43(19).

HR-MS: 99,0799 ($\text{C}_6\text{H}_9^2\text{HO}$, calc. 99,0794).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ 3347, 3025, 2934, 2862, 2132, 1648, 1436, 1389, 1325, 1223, 1170, 1089, 1011, 936, 894, 719, 665 cm^{-1} .

6.4.9 (1R)-[1- ^2H]-[2E,6E]-Farnesol ((1R)-78)¹⁰³

In 40 ml Reaktionspuffer I (60 mM KH_2PO_4 , pH = 7,2) wurden 153,4 mg Farnesal (**80**) (0,69 mmol), 87,9 mg [1- ^2H]-Cyclohexenol (**81**) (0,90 mmol), 32,7 mg NAD^+ (0,048 mmol) und 106,8 mg HLADH (53,4 U) gelöst. Nach Zugabe eines Tropfens Tween 20 wurde zwei Tage in Dunkelheit bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung dreimal mit je 30 ml eines Pentan-Diethylether-Gemisches (95:5 [v/v]) extrahiert, wobei die Phasen durch Zentrifugation (3000 g, 4 min, 4 °C) getrennt wurden. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die chromatographische Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel (1 g, Pasteurpipette) mit Pentan: Diethylether (5:1 [v/v]) und ergab ein farbloses Öl.

Ausbeute: 69,9 mg (45 %)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 5,42 (d, $J = 6,9$ Hz 1H), 5,10 (m, 2H), 4,13 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H), 2,15-1,95 (m, 8H), 1,68 (s, 6H), 1,60 (s, 6H) ppm.

^{13}C -NMR (126 MHz, CDCl_3): δ 139,9, 135,4, 131,3, 124,3, 123,8, 123,3, 59,1 (t, $J = 22,1$ Hz, 1C), 39,7, 39,5, 26,7, 26,3, 25,7, 17,7, 16,3, 16,0 ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) 223($[\text{M}]^+$ (0,3)), 205(1), 191(2), 180(2), 162(5), 148(2), 136(13), 123(11), 109(9), 94(15), 81(31), 69(100), 55(8).

HR-MS: 223,2053 ($\text{C}_{15}\text{H}_{25}^2\text{HO}$, calc. 223,2046).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ 3322, 2967, 2918, 2855, 2155, 1667, 1445, 1380, 1193, 1152, 1108, 1018, 939, 901, 833, 741 cm^{-1} .

6.4.10 (1S)-[1- ^2H]--(2E,6E)-Farnesol ((1S)-78)¹⁰³

In 60 ml Reaktionspuffer II (100 mM Glycin pH = 8,8) wurden 213 mg [1- ^2H]-Farnesal ([1- ^2H]-80) (0,23 mmol), 100 mg NADH (0,13 mmol) und 1,1 ml HLADH (22,6 U) gelöst. Nach Zugabe von 1 ml Dioxan und 2 ml abs. Ethanol wurde vier Tage in Dunkelheit bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wurde die Mischung dreimal mit je 50 ml eines Pentan-Diethylether-Gemisches (95:5 [v/v]) extrahiert, wobei die Phasen durch Zentrifugieren (3000 g, 4 min, 4 °C) getrennt wurden. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na_2SO_4 getrocknet und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Die chromatographische Aufreinigung des Rohproduktes erfolgte an Kieselgel (1 g, Pasteurpipette) mit Pentan: Diethylether (5:1 [v/v]) und ergab ein farbloses Öl.

Ausbeute: 116 mg (54 %)

Die spektroskopischen Daten sind mit denen von (1R)-78 identisch.

6.4.11 (1R)-[1- ^2H]--(2E,6E)-Farnesyldiphosphat ((1R)-22)^{102,103}

Auf dem gleichen Weg wie unter Abschnitt 6.4.2 beschrieben, wurden 22,4 mg (1R)-[1- ^2H]--(2E,6E)-Farnesol ((1R)-78) (0,05 mmol) phosphoryliert. Die Enantiomerenreinheit von (1R)-22 wurde durch ^1H -NMR-spektroskopische Analyse nach Abspaltung der Diphosphatgruppe (siehe Abschnitt 6.4.20) anhand des Mosher-Esters des freigesetzten Alkohols bestimmt (siehe Abschnitt 6.4.18).^{177,178} Dabei ließen sich keine Signale des optischen Antipoden detektieren (> 97 % ee).

Ausbeute: 26,6 mg (57 %)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ 5,48 (d, $J = 6,7$ Hz, 1H), 5,27-5,16 (m, 2H), 4,46 (m, 1H), 2,21-2,07 (m, 6H), 2,06-2,00 (m, 2H), 1,73 (s, 3H), 1,69 (s, 3H), 1,63 (s, 6H).

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): δ 143,7, 137,6, 134,5, 125,5, 125,3, 121,0, 39,9, 39,8, 26,8, 26,7, 25,8, 18,0, 16,7, 16,2.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ 3424, 2971, 2360, 1650, 1563, 1452, 1411, 1333, 1215, 1130, 943, 799, 728, 555 cm^{-1} .

6.4.12 (1S)-[1- ^2H]-(*2E,6E*)-Farnesyldiphosphat ((1S)-22)^{102,103}

Auf dem gleichen Weg wie unter Abschnitt 6.4.2 beschrieben, wurden 22,6 mg (1S)-[1- ^2H]-(*2E,6E*)-Farnesol ((1S)-78) (0,05 mmol) phosphoryliert. Die Enantiomerenreinheit von (1S)-22 wurde durch $^1\text{H-NMR}$ -spektroskopische Analyse nach Abspaltung der Diphosphatgruppe (siehe Abschnitt 6.4.20) anhand des *Mosher*-Esters des freigesetzten Alkohols bestimmt (siehe Abschnitt 6.4.19).^{177,178} Dabei ließen sich keine Signale des optischen Antipoden detektieren (> 97 % *ee*).

Ausbeute: 25,7 mg (55 %)

Die spektroskopischen Daten sind mit denen von (1*R*)-22 identisch.

6.4.13 (2Z,6E)-Farnesol (79)

Zu einer Lösung aus 390 mg (2*Z,6E*)-77 (1,5 mmol) in 20 ml trockenem THF wurden bei 0 °C unter Argon 75 mg Lithiumdeuterid (1,8 mmol) zugegeben. Nach zweistündigem Rühren bei 0 °C wurde die Reaktionsmischung zuerst mit 15 ml Diethylether verdünnt und anschließend 15 ml gesättigte Natrium-Kalium-Tartrat-Lösung zugetropft. Das Zweiphasengemisch wurde separiert und die wässrige Phase dreimal mit je 10 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und im Vakuum eingeeengt. Nach der chromatographischen Reinigung an Kieselgel (Petrolether:Diethylether 3:2 [v/v]) erhielt man ein farbloses Öl.

Ausbeute: 230 mg (70 %)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 5,44 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 5,10 (m, 2H), 4,10 (d, $J = 7,2$ Hz, 2H), 2,02-2,15 (m, 6H), 1,95-2,01 (m, 2H), 1,75 (s, 3H), 1,68 (s, 3H), 1,60 (s, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ 140,1, 136,0, 131,5, 124,4, 124,2, 123,6, 59,1, 39,7, 32,0, 26,7, 26,5, 25,7, 23,4, 17,7, 16,0 ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) 222($[\text{M}]^+$ (0,4)), 204(1), 189(2), 179(2), 161(5), 148(2), 136(7), 121(8), 107(14), 93(27), 84(8), 81(26), 69(100), 55(13).

HR-MS: 222,1990 ($\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$, calc. 222,1984).

IR (Film): $\tilde{\nu}$: 3332, 2965, 2925, 2856, 2728, 1711, 1668, 1448, 1378, 1245, 1106, 1001, 833, 741, 601 cm^{-1} .

6.4.14 (2Z,6E)-Farnesyldiphosphat (76)¹⁵⁹

Auf dem gleichen Weg wie unter Abschnitt 6.4.2 beschrieben, wurden 46,0 mg (2Z,6E)-Farnesol (79) (0,1 mmol) phosphoryliert.

Ausbeute: 44,0 mg (50 %)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ 5,41 (m, 1H), 5,14 (m, 2H), 4,42 (m, 2H), 2,02-2,16 (m, 6H), 1,93-2,00 (m, 2H), 1,72(s, 3H), 1,63 (s, 3H), 1,57(s, 6H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): δ 143,9, 137,7, 134,2, 125,5, 125,0, 121,6, 63,7, 39,9, 32,3, 27,1, 26,9, 25,9, 23,8, 18,0, 16,3 ppm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ 3169, 2970, 1777, 1665, 1447, 1401, 1222, 1108, 1019, 972, 920, 807, 706 cm^{-1} .

6.4.15 (3R)-[11,11,11,12,12,12- $^2\text{H}_6$]-Nerolidyldiphosphat ((3R)- d_6 -25)

Auf dem gleichen Weg wie unter Abschnitt 6.4.2 beschrieben, wurden 53 mg (3R)-[11,11,11,12,12,12- $^2\text{H}_6$]-Nerolidol ((3R)- d_6 -48)¹⁰⁶ (0,12 mmol) phosphoryliert.

Ausbeute: 35,2 mg (34 %)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ 6,06 (dd, $J = 16,8, 11,1$ Hz, 1H), 5,16 (m, 4H), 1,91-2,24 (m, 6H), 1,74 - 1,23 (m, 8H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): δ 144,0, 137,5, 134,4, 125,8, 125,6, 114,2, 82,8, 42,3, 39,9, 26,8, 24,7, 23,4, 16,3 ppm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ 3423, 2567, 2191, 1922, 1668, 1627, 1568, 1452, 1404, 1352, 1098, 916, 835, 797, 700, 658, 558 cm^{-1} .

6.4.16 (3S)-Nerolidyldiphosphat ((3S)-25)

Auf dem gleichen Weg, wie unter Abschnitt 6.4.2 beschrieben, wurden 44 mg (3S)-Nerolidol ((3S)-48) (Roth, 0,12 mmol) phosphoryliert.

Ausbeute: 26,3 mg (31 %)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, D_2O): δ 6,06 (dd, $J = 17,5, 10,9$ Hz, 1H), 5,23 - 5,07 (m, 3H), 5,02 (d, $J = 10,9$ Hz, 1H), 2,13 - 1,91 (m, 6H), 1,64 (s, 3H), 1,70 - 1,53 (m, 1H), 1,57 (s, 6H), 1,25 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, D_2O): δ 145,6, 137,2, 134,5, 126,2, 125,5, 113,1, 79,6, 42,5, 39,8, 26,8, 25,8, 24,8, 23,5, 17,9, 16,2 ppm.

IR (KBr): $\tilde{\nu}$ 3423, 2968, 2555, 1925, 1670, 1626, 1572, 1452, 1359, 1114, 1047, 1033, 997, 928, 834, 705, 658 cm^{-1} .

6.4.17 (3RS)-Nerolidol ((3RS)-48)

Zu einer Lösung aus 100 mg Geranylaceton (0,5 mmol) und 10 ml trockenem Diethylether wurde bei 0 °C unter Argon 550 μl einer Vinylmagnesiumbromidlösung (1 mol l^{-1} in THF) zugetropft. Die Reaktionsmischung wurde 90 min bei 0 °C gerührt und anschließend mit 10 ml gesättigter NH_4Cl gequenchet. Die organische Phase wurde abgetrennt und die wässrige mit je 10 ml Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel im

Vakuum entfernt. Nach chromatographischer Reinigung an Kieselgel (Petrolether:Diethylether 2:1 [v/v]) erhielt man ein farbloses Öl.

Ausbeute: 94,4 mg (83 %)

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 5,91 (dd, $J = 17,4, 10,8$ Hz, 1H), 5,21 (d, $J = 17,3$ Hz, 1H), 5,16 - 5,11 (m, 1H), 5,10 - 5,07 (m, 1H), 5,06 (d, $J = 10,7$ Hz, 1H), 2,11 - 1,94 (m, 6H), 1,68 (s, 3H), 1,59 (s, 6H), 1,63 - 1,52 (m, 2H), 1,28 (s, 3H) ppm.

$^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, CDCl_3): δ 145,1, 135,6, 131,4, 124,1, 124,2, 111,7, 73,5, 42,1, 39,7, 27,9, 26,6, 25,7, 22,7, 17,7, 16,0 ppm.

MS (EI, 70 eV): m/z (%) 204($[\text{M}]^+$ (1)), 189(5), 179(2), 161(22), 148(4), 136(26), 121(18), 107(43), 93(67), 81(29), 69(100), 55(30).

HR-MS: 222,1980 ($\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$, calc. 222,1984).

IR (Film): $\tilde{\nu}$ 3406, 3086, 2969, 2926, 2856, 1845, 1642, 1451, 1411, 1376, 1109, 995, 920, 839, 742, 690, 595 cm^{-1} .

6.4.18 Mosher-Ester von (1R)-[1- ^2H]--(2E,6E)-Farnesol ((1R)-78)^{177,178}

Zu einer Lösung aus 1 mg (1R)-[1- ^2H]--(2E,6E)-Farnesol ((1R)-78), 7,2 mg DMAP und 10 μl Triethylamin wurden 5 μl (S)-(+)- α -Methoxy- α -trifluormethylphenylacetylchlorid ((S)-MTPA) hinzugefügt und 15 min geschüttelt. Danach wurden 5 μl 3-Dimethylamino-1-propylamin zugegeben und weitere 2 min geschüttelt. Das Lösungsmittel wurde mit einem Argonstrom ausgetragen und das Rohprodukt über eine kleine Silicasäule (1 g Kieselgel, Pasteurpipette) unter Verwendung eines Hexan-Essigester-Laufmittelgemischs (4:1 [v/v]) gereinigt. Man erhielt ein farbloses Öl.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 7,53-7,50 (m, 2H), 7,41-7,35 (m, 3H), 5,39 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 5,08 (m, 2H), 4,83 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H), 3,56 (s, 1H), 2,13-2,01 (m, 6H), 1,99-1,94 (m, 2H), 1,72 (s, 3H), 1,68 (s, 3H), 1,59 (s, 6H) ppm.

6.4.19 Mosher-Ester von (1S)-[1-²H]-(2E,6E)-Farnesol ((1S)-78)^{177,178}

Synthese und Aufarbeitung sind analog zum *Mosher*-Ester von (1S)-[1-²H]-(2E,6E)-Farnesol ((1S)-78).

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): Identisch mit dem *Mosher*-Ester von (1R)-78 bis auf: δ 4,78 (d, *J* = 7,3 Hz, 1H) ppm.

6.4.20 Dephosphorylierung

In 2 ml Puffer (0,1 M Glycin, 1 mM MgCl₂, 1 mM ZnCl₂, pH = 8,0) wurden 6 mg des entsprechenden Diphosphates gelöst, mit 10 Units alkalischer Phosphatase aus *E. coli* (Sigma Aldrich) versetzt und über Nacht bei 33 °C geschüttelt. Der freigesetzte Alkohol wurde dreimal mit je 1 ml Diethylether extrahiert. Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet und das Lösungsmittel unter Argon entfernt.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Connolly, J. D.; Hill, R. A.; Chapman & Hall, New York: 1992.
- (2) Fraga, B. M. *Natural Product Reports* 2000, 17, 483.
- (3) Fraga, B. M. *Natural Product Reports* 2009, 26, 1125.
- (4) Schulz, S.; Dickschat, J. S. *Natural Product Reports* 2007, 24, 814.
- (5) Breitmaier, E. *Terpenes: Flavors, Fragrances, Pharmaca, Pheromones*; 1st ed.; Wiley-VCH, 2006.
- (6) Pezzuto, J. M. *Biochemical Pharmacology* 1997, 53, 121.
- (7) Robert, A.; Cazelles, J.; Meunier, B. *Angewandte Chemie International Edition* 2001, 40, 1954.
- (8) Ro, D. K.; Paradise, E. M.; Ouellet, M.; Fisher, K. J.; Newman, K. L.; Ndungu, J. M.; Ho, K. A.; Eachus, R. A.; Ham, T. S.; Kirby, J.; Chang, M. C. Y.; Withers, S. T.; Shiba, Y.; Sarpong, R.; Keasling, J. D. *Nature* 2006, 440, 940.
- (9) Enserink, M. *Science* 2005, 307, 33.
- (10) Reichstein, T. *Angewandte Chemie* 1951, 63, 412.
- (11) Langenheim, J. H. *Journal of Chemical Ecology* 1994, 20, 1223.
- (12) Stipanovic, R.; Bell, A.; Benedict, C. In *Biologically Active Natural Products: Agrochemicals* Cutler, H. G., Cutler, S. J., Eds.; CRC Press: Florida, 1999, p 211.
- (13) Turlings, T. C. J.; Tumlinson, J. H.; Lewis, W. J. *Science* 1990, 250, 1251.
- (14) Schnee, C.; Köllner, T. G.; Held, M.; Turlings, T. C. J.; Gershenzon, J.; Degenhardt, J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, 103, 1129.
- (15) Robert, A. R.; Eran, P. *Plant Species Biology* 1999, 14, 95.
- (16) Dudareva, N.; Cseke, L.; Blanc, V. M.; Pichersky, E. *Plant Cell* 1996, 8, 1137.
- (17) Pichersky, E.; Gershenzon, J. *Current Opinion in Plant Biology* 2002, 5, 237.
- (18) Unsicker, S. B.; Kunert, G.; Gershenzon, J. *Current Opinion in Plant Biology* 2009, 12, 479.
- (19) Arimura, G.; Ozawa, R.; Shimoda, T.; Nishioka, T.; Boland, W.; Takabayashi, J. *Nature* 2000, 406, 512.
- (20) Arimura, G.; Ozawa, R.; Nishioka, T.; Boland, W.; Koch, T.; Kühnemann, F.; Takabayashi, J. *Plant Journal* 2002, 29, 87.

- (21) Wallach, O. *Terpene und Campher: Zusammenfassung eigener Untersuchungen auf dem Gebiet der alicyclischen Kohlenstoffverbindungen*; 2. ed.; Leipzig:Veit 1914.
- (22) Ruzicka, L. *Experientia* 1953, 9, 357.
- (23) Lynen, F.; Eggerer, H.; Henning, U.; Kessel, I. *Angewandte Chemie* 1958, 70, 738.
- (24) Flesch, G.; Rohmer, M. *European Journal of Biochemistry* 1988, 175, 405.
- (25) Rohmer, M.; Knani, M.; Simonin, P.; Sutter, B.; Sahn, H. *Biochemical Journal* 1993, 295, 517.
- (26) Schwender, J.; Seemann, M.; Lichtenthaler, H. K.; Rohmer, M. *Biochemical Journal* 1996, 316, 73.
- (27) Lichtenthaler, H. K.; Schwender, J.; Disch, A.; Rohmer, M. *Febs Letters* 1997, 400, 271.
- (28) Lichtenthaler, H. K. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 1999, 50, 47.
- (29) Disch, A.; Rohmer, M. *FEMS Microbiology Letters* 1998, 168, 201.
- (30) Eisenreich, W.; Rohdich, F.; Bacher, A. *Trends in Plant Science* 2001, 6, 78.
- (31) Eisenreich, W.; Bacher, A.; Arigoni, D.; Rohdich, F. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2004, 61, 1401.
- (32) Rodriguez-Concepcion, M.; Boronat, A. *Plant Physiology* 2002, 130, 1079.
- (33) Gershenzon, J.; Croteau, R. B. *Lipid metabolism in plants* 1993, 339.
- (34) McGarvey, D. J.; Croteau, R. *Plant Cell* 1995, 7, 1015.
- (35) Brandt, W.; Bräuer, L.; Günnewich, N.; Kufka, J.; Rausch, F.; Schulze, D.; Schulze, E.; Weber, R.; Zakharova, S.; Wessjohann, L. *Phytochemistry* 2009, 70, 1758.
- (36) Bick, J. A.; Lange, B. M. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2003, 415, 146.
- (37) Dudareva, N.; Andersson, S.; Orlova, I.; Gatto, N.; Reichelt, M.; Rhodes, D.; Boland, W.; Gershenzon, J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102, 933.
- (38) Hemmerlin, A.; Hoeffler, J.-F.; Meyer, O.; Tritsch, D.; Kagan, I. A.; Grosdemange-Billiard, C.; Rohmer, M.; Bach, T. J. *Journal of Biological Chemistry* 2003, 278, 26666.
- (39) Laule, O.; Fürholz, A.; Chang, H.-S.; Zhu, T.; Wang, X.; Heifetz, P. B.; Gruissem, W.; Lange, M. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003, 100, 6866.

- (40) Jux, A.; Gleixner, G.; Boland, W. *Angewandte Chemie International Edition* 2001, 40, 2091.
- (41) Nagegowda, D. A.; Gutensohn, M.; Wilkerson, C. G.; Dudareva, N. *Plant Journal* 2008, 55, 224.
- (42) Aharoni, A.; Giri, A. P.; Verstappen, F. W. A.; Berteaux, C. M.; Sevenier, R.; Sun, Z. K.; Jongsma, M. A.; Schwab, W.; Bouwmeester, H. J. *Plant Cell* 2004, 16, 3110.
- (43) Aharoni, A.; Giri, A. P.; Deurlein, S.; Griepink, F.; de Kogel, W. J.; Verstappen, F. W. A.; Verhoeven, H. A.; Jongsma, M. A.; Schwab, W.; Bouwmeester, H. J. *Plant Cell* 2003, 15, 2866.
- (44) Degenhardt, J.; Köllner, T. G.; Gershenzon, J. *Phytochemistry* 2009, 70, 1621.
- (45) Schenk, D. J.; Starks, C. M.; Manna, K. R.; Chappell, J.; Noel, J. P.; Coates, R. M. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2006, 448, 31.
- (46) Bohlmann, J.; Meyer-Gauen, G.; Croteau, R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, 95, 4126.
- (47) Mercke, P.; Bengtsson, M.; Bouwmeester, H. J.; Posthumus, M. A.; Brodelius, P. E. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000, 381, 173.
- (48) Wendt, K. U.; Schulz, G. E. *Structure* 1998, 6, 127.
- (49) Wendt, K. U.; Poralla, K.; Schulz, G. E. *Science* 1997, 277, 1811.
- (50) Thoma, R.; Schulz-Gasch, T.; D'Arcy, B.; Benz, J.; Aebi, J.; Dehmlow, H.; Hennig, M.; Stihle, M.; Ruf, A. *Nature* 2004, 432, 118.
- (51) Christianson, D. W. *Current Opinion in Chemical Biology* 2008, 12, 141.
- (52) Christianson, D. W. *Chemical Reviews* 2006, 106, 3412.
- (53) Dudareva, N.; Martin, D.; Kish, C. M.; Kolosova, N.; Gorenstein, N.; Faldt, J.; Miller, B.; Bohlmann, J. *Plant Cell* 2003, 15, 1227.
- (54) Bohlmann, J.; Steele, C. L.; Croteau, R. *Journal of Biological Chemistry* 1997, 272, 21784.
- (55) Steele, C. L.; Crock, J.; Bohlmann, J.; Croteau, R. *Journal of Biological Chemistry* 1998, 273, 2078.
- (56) Chen, X. Y.; Chen, Y.; Heinsteins, P.; Davisson, V. J. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1995, 324, 255.
- (57) Lesburg, C. A.; Caruthers, J. M.; Paschall, C. M.; Christianson, D. W. *Current Opinion in Structural Biology* 1998, 8, 695.
- (58) Sacchettini, J. C.; Poulter, C. D. *Science* 1997, 277, 1788.
- (59) Cane, D. E. *Comprehensive Natural Products Chemistry* 1999, 2, 155.

- (60) Davis, E. M.; Croteau, R. In *Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids*; Springer-Verlag: Berlin, 2000; Vol. 209, p 53.
- (61) Croteau, R. *Chemical Reviews* 1987, 87, 929.
- (62) Allinger, N. L.; Siefert, J. H. *Journal of the American Chemical Society* 1975, 97, 752.
- (63) Cane, D. E. *Chemical Reviews* 1990, 90, 1089.
- (64) Satterwhite, D. M.; Wheeler, C. J.; Croteau, R. *Journal of Biological Chemistry* 1985, 260, 3901.
- (65) Cane, D. E.; Prabhakaran, P. C.; Oliver, J. S.; McIlwaine, D. B. *Journal of the American Chemical Society* 1990, 112, 3209.
- (66) Cane, D. E.; Abell, C.; Harrison, P. H. M.; Hubbard, B. R.; Kane, C. T.; Lattman, R.; Oliver, J. S.; Weiner, S. W. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 1991, 332, 123.
- (67) Köllner, T. G.; Schnee, C.; Li, S.; Svatos, A.; Schneider, B.; Gershenzon, J.; Degenhardt, J. *Journal of Biological Chemistry* 2008, 283, 20779.
- (68) Faraldos, J. A.; Wu, S.; Chappell, J.; Coates, R. M. *Journal of the American Chemical Society* 2010, 132, 2998.
- (69) Arigoni, D. *Pure and Applied Chemistry* 1975, 41, 219.
- (70) Nabeta, K.; Kigure, K.; Fujita, M.; Nagoya, T.; Ishikawa, T.; Okuyama, H.; Takasawa, T. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* 1995, 1935.
- (71) Cane, D. E.; Tandon, M. *Journal of the American Chemical Society* 1995, 117, 5602.
- (72) Benedict, C. R.; Lu, J. L.; Pettigrew, D. W.; Liu, J. G.; Stipanovic, R. D.; Williams, H. J. *Plant Physiology* 2001, 125, 1754.
- (73) Reardon, D.; Farber, G. K. *The FASEB Journal* 1995, 9, 497.
- (74) Cane, D. E.; Kang, I. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2000, 376, 354.
- (75) Rynkiewicz, M. J.; Cane, D. E.; Christianson, D. W. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, 98, 13543.
- (76) Gennadios, H. A.; Gonzalez, V.; Di Costanzo, L.; Li, A.; Yu, F.; Miller, D. J.; Allemann, R. K.; Christianson, D. W. *Biochemistry* 2009, 48, 6175.
- (77) Shishova, E. Y.; Di Costanzo, L.; Cane, D. E.; Christianson, D. W. *Biochemistry* 2007, 46, 1941.
- (78) Dougherty, D. A. *Science* 1996, 271, 163.

- (79) Aaron, J. A.; Lin, X.; Cane, D. E.; Christianson, D. W. *Biochemistry* 2010, *49*, 1787.
- (80) Köllner, T. G.; O'Maille, P. E.; Gatto, N.; Boland, W.; Gershenzon, J.; Degenhardt, J. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2006, *448*, 83.
- (81) Yoshikuni, Y.; Ferrin, T. E.; Keasling, J. D. *Nature* 2006, *440*, 1078.
- (82) O'Maille, P. E.; Malone, A.; Dellas, N.; Andes Hess, B.; Smentek, L.; Sheehan, I.; Greenhagen, B. T.; Chappell, J.; Manning, G.; Noel, J. P. *Nature Chemical Biology* 2008, *4*, 617.
- (83) Starks, C. M.; Back, K. W.; Chappell, J.; Noel, J. P. *Science* 1997, *277*, 1815.
- (84) Rising, K. A.; Starks, C. M.; Noel, J. P.; Chappell, J. *Journal of the American Chemical Society* 2000, *122*, 1861.
- (85) Cool, L. G. *Phytochemistry* 2005, *66*, 249.
- (86) Young, N. D.; Cannon, S. B.; Sato, S.; Kim, D.; Cook, D. R.; Town, C. D.; Roe, B. A.; Tabata, S. *Plant Physiology* 2005, *137*, 1174.
- (87) Choi, H.-K.; Mun, J.-H.; Kim, D.-J.; Zhu, H.; Baek, J.-M.; Mudge, J.; Roe, B.; Ellis, N.; Doyle, J.; Kiss, G. B.; Young, N. D.; Cook, D. R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004, *101*, 15289.
- (88) Sato, S.; Isobe, S.; Tabata, S. *Current Opinion in Plant Biology* 2010, *13*, 146.
- (89) Arimura, G.; Kost, C.; Boland, W. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2005, *1734*, 91.
- (90) Howe, G. A.; Jander, G. *Annual Review of Plant Biology* 2008, *59*, 41.
- (91) Mithöfer, A.; Boland, W. *Plant Physiology* 2008, *146*, 825.
- (92) Leitner, M.; Boland, W.; Mithöfer, A. *New Phytologist* 2005, *167*, 597.
- (93) Leitner, M.; Kaiser, R.; Hause, B.; Boland, W.; Mithöfer, A. *Mycorrhiza* 2010, *20*, 89.
- (94) McKay, S. A. B.; Hunter, W. L.; Godard, K.-A.; Wang, S. X.; Martin, D. M.; Bohlmann, J.; Plant, A. L. *Plant Physiology* 2003, *133*, 368.
- (95) Köllner, T. G.; Schnee, C.; Gershenzon, J.; Degenhardt, J. a. *Plant Cell* 2004, *16*, 1115.
- (96) Gomez, S. K.; Cox, M. M.; Bede, J. C.; Inoue, K.; Alborn, H. T.; Tumlinson, J. H.; Korth, K. L. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 2005, *58*, 114.
- (97) Navia-Giné, W. G.; Yuan, J. S.; Mauromoustakos, A.; Murphy, J. B.; Chen, F.; Korth, K. L. *Plant Physiology and Biochemistry* 2009, *47*, 416.

- (98) Arimura, G. I.; Garms, S.; Maffei, M.; Bossi, S.; Schulze, B.; Leitner, M.; Mithöfer, A.; Boland, W. *Planta* 2008, 227, 453.
- (99) Jez, J. M.; Ferrer, J.-L.; Bowman, M. E.; Dixon, R. A.; Noel, J. P. *Biochemistry* 2000, 39, 890.
- (100) Upadhyay, R. K.; Misra, L. N.; Singh, G. *Phytochemistry* 1991, 30, 691.
- (101) Muller, P. *Pure and Applied Chemistry* 1994, 66, 1077.
- (102) Cane, D. E.; Iyengar, R.; Shiao, M. S. *Journal of the American Chemical Society* 1981, 103, 914.
- (103) Cane, D. E.; Oliver, J. S.; Harrison, P. H. M.; Abell, C.; Hubbard, B. R.; Kane, C. T.; Lattman, R. *Journal of the American Chemical Society* 1990, 112, 4513.
- (104) Cramer, F.; Böhm, W. *Angewandte Chemie* 1959, 71, 775.
- (105) Keller, R. K.; Thompson, R. *Journal of Chromatography* 1993, 645, 161.
- (106) Donath, J., Dissertation, Universität Karlsruhe (TH), 1994.
- (107) Schmidt, C. O.; Bouwmeester, H. J.; Franke, S.; König, W. A. *Chirality* 1999, 11, 353.
- (108) Benedict, C. R.; Alchanati, I.; Harvey, P. J.; Liu, J. G.; Stipanovic, R. D.; Bell, A. A. *Phytochemistry* 1995, 39, 327.
- (109) Matsuo, A.; Nozaki, H.; Kubota, N.; Uto, S.; Nakayama, M. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* 1984, 203.
- (110) Nabeta, K.; Yamamoto, M.; Fukushima, K.; Katoh, K. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* 2000, 2703.
- (111) Pyun, H. J.; Coates, R. M.; Wagschal, K. C.; McGeady, P.; Croteau, R. B. *Journal of Organic Chemistry* 1993, 58, 3998.
- (112) Wagschal, K. C.; Pyun, H. J.; Coates, R. M.; Croteau, R. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1994, 308, 477.
- (113) Facchini, P. J.; Chappell, J. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1992, 89, 11088.
- (114) Khan, V. A.; Tkachev, A. V.; Pentegova, V. A. *Khimiya Prirodnikh Soedinenii* 1988, 712.
- (115) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. *Nucl. Acids Res.* 2000, 28, 235.
- (116) Altschul, S. F.; Madden, T. L.; Schaffer, A. A.; Zhang, J.; Zhang, Z.; Miller, W.; Lipman, D. J. *Nucleic Acids Research* 1997, 25, 3389.
- (117) Laskowski, R. A.; MacArthur, M. W.; Moss, D. S.; Thornton, J. M. *Journal of Applied Crystallography* 1993, 26, 283.

- (118) Manfred, J. S. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 1993, 17, 355.
- (119) Korb, O.; Stütze, T.; Exner, T. E. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2009, 49, 84.
- (120) Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. *Journal of Molecular Graphics* 1996, 14, 33.
- (121) Aharoni, A.; Jongsma, M. A.; Bouwmeester, H. J. *Trends in Plant Science* 2005, 10, 594.
- (122) Arimura, G.; Huber, D. P. W.; Bohlmann, J. *Plant Journal* 2004, 37, 603.
- (123) Lucker, J.; Bouwmeester, H. J.; Schwab, W.; Blaas, J.; van der Plas, L. H. W.; Verhoeven, H. A. *Plant Journal* 2001, 27, 315.
- (124) Arimura, G.; Ozawa, R.; Kugimiya, S.; Takabayashi, J.; Bohlmann, J. *Plant Physiology* 2004, 135, 1976.
- (125) Picaud, S.; Olofsson, L.; Brodelius, M.; Brodelius, P. E. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2005, 436, 215.
- (126) Marschner, H.; Marschner, H. In *Mineral nutrition of higher plants, Second edition*; Academic Press Ltd.; Academic Press, Inc., London: 1995, 889p.
- (127) Alchanati, I.; Patel, J. A. A.; Liu, J.; Benedict, C. R.; Stipanovic, R. D.; Bell, A. A.; Cui, Y.; Magill, C. W. *Phytochemistry* 1998, 47, 961.
- (128) Cane, D. E.; Ha, H. J.; Pargellis, C.; Waldmeier, F.; Swanson, S.; Murthy, P. P. N. *Bioorganic Chemistry* 1985, 13, 246.
- (129) Jia, J. W.; Crock, J.; Lu, S.; Croteau, R.; Chen, X. Y. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1999, 372, 143.
- (130) Chen, F.; Tholl, D.; D'Auria, J. C.; Farooq, A.; Pichersky, E.; Gershenzon, J. *Plant Cell* 2003, 15, 481.
- (131) Schie, C.; Haring, M.; Schuurink, R. *Plant Molecular Biology* 2007.
- (132) Schnee, C.; Köllner, T. G.; Gershenzon, J.; Degenhardt, J. *Plant Physiology* 2002, 130, 2049.
- (133) Crowell, A. L.; Williams, D. C.; Davis, E. M.; Wildung, M. R.; Croteau, R. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2002, 405, 112.
- (134) Martin, D. M.; Faldt, J.; Bohlmann, J. *Plant Physiology* 2004, 135, 1908.
- (135) Chen, X.; Yauk, Y.; Nieuwenhuizen, N. J.; Matich, A. J.; Wang, M. Y.; Perez, R. L.; Atkinson, R. G.; Beuning, L. L. *Functional Plant Biology* 2010, 37, 232.
- (136) Bruck, T. B.; Kerr, R. G. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 2006, 143, 269.
- (137) Donath, J.; Boland, W. *Phytochemistry* 1995, 39, 785.

- (138) Degenhardt, J.; Gershenzon, J. *Planta* 2000, *210*, 815.
- (139) Herde, M. *Plant Cell* 2008, *20*, 1152.
- (140) Aharoni, A.; Jongsma, M.; Kim, T.-Y.; Ri, M.-B.; Giri, A.; Verstappen, F.; Schwab, W.; Bouwmeester, H. *Phytochemistry Reviews* 2006, *5*, 49.
- (141) Wu, S.; Schalk, M.; Clark, A.; Miles, R. B.; Coates, R.; Chappell, J. *Nature Biotechnology* 2006, *24*, 1441.
- (142) Bohlmann, J.; Crock, J.; Jetter, R.; Croteau, R. a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, *95*, 6756.
- (143) Crock, J.; Wildung, M.; Croteau, R. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, *94*, 12833.
- (144) Mercke, P.; Crock, J.; Croteau, R.; Brodelius, P. E. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1999, *369*, 213.
- (145) Picaud, S.; Brodelius, M.; Brodelius, P. E. *Phytochemistry* 2005, *66*, 961.
- (146) Cai, Y.; Jia, J. W.; Crock, J.; Lin, Z. X.; Chen, X. Y.; Croteau, R. *Phytochemistry* 2002, *61*, 523.
- (147) Bouwmeester, H. J.; Kodde, J.; Verstappen, F. W. A.; Altug, I. G.; de Kraker, J. W.; Wallaart, T. E. *Plant Physiology* 2002, *129*, 134.
- (148) He, X. F.; Cane, D. E. *Journal of the American Chemical Society* 2004, *126*, 2678.
- (149) Adio, A. M. *Tetrahedron* 2009, *65*, 1533.
- (150) Nishimura, K.; Shinoda, N.; Hirose, Y. *Tetrahedron Letters* 1969, *10*, 3097.
- (151) Nabeta, K.; Fujita, M.; Komuro, K.; Katayama, K.; Takasawa, T. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* 1997, 2065.
- (152) Cane, D. E.; Tandon, M. *Tetrahedron Letters* 1994, *35*, 5355.
- (153) O'Maille, P. E.; Chappell, J.; Noel, J. P. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2006, *448*, 73.
- (154) Vedula, L. S.; Jiang, J.; Zakharian, T.; Cane, D. E.; Christianson, D. W. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2008, *469*, 184.
- (155) Hong, Y. J.; Tantillo, D. J. *Journal of the American Chemical Society* 2009, *131*, 7999.
- (156) Felicetti, B.; Cane, D. E. *Journal of the American Chemical Society* 2004, *126*, 7212.
- (157) Whittington, D. A.; Wise, M. L.; Urbansky, M.; Coates, R. M.; Croteau, R. B.; Christianson, D. W. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002, *99*, 15375.

- (158) Noel, J. P.; Dellas, N.; Faraldos, J. A.; Zhao, M.; Hess, B. A.; Smentek, L.; Coates, R. M.; O'Maille, P. E. *ACS Chemical Biology* 2010, 5, 377.
- (159) Faraldos, J. A.; O'Maille, P. E.; Dellas, N.; Noel, J. P.; Coates, R. M. *Journal of the American Chemical Society* 2010, 132, 4281.
- (160) Schulbach, M. C.; Brennan, P. J.; Crick, D. C. *Journal of Biological Chemistry* 2000, 275, 22876.
- (161) Schulbach, M. C.; Mahapatra, S.; Macchia, M.; Barontini, S.; Papi, C.; Minutolo, F.; Bertini, S.; Brennan, P. J.; Crick, D. C. *Journal of Biological Chemistry* 2001, 276, 11624.
- (162) Thulasiram, H. V.; Poulter, C. D. *Journal of the American Chemical Society* 2006, 128, 15819.
- (163) Picaud, S.; Mercke, P.; He, X. F.; Sterner, O.; Brodelius, M.; Cane, D. E.; Brodelius, P. E. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2006, 448, 150.
- (164) Cane, D. E.; Ha, H. J. *Journal of the American Chemical Society* 1988, 110, 6865.
- (165) Lin, X.; Cane, D. E. *Journal of the American Chemical Society* 2009, 131, 6332.
- (166) Köllner, T. G.; Gershenzon, J.; Degenhardt, J. *Phytochemistry* 2009, 70, 1139.
- (167) Bradford, M. M. *Analytical Biochemistry* 1976, 72, 248.
- (168) Laemmli, U. K. *Nature* 1970, 227, 680.
- (169) Adams, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*; Fourth ed.; Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA, 2007.
- (170) Kováts, E. *Helvetica Chimica Acta* 1958, 41, 1915.
- (171) Ohta, Y.; Ohara, K.; Hirose, Y. *Tetrahedron Letters* 1968, 9, 4181.
- (172) Bülow, N.; König, W. A. *Phytochemistry* 2000, 55, 141.
- (173) König, W. A.; Bülow, N.; Fricke, C.; Melching, S.; Rieck, A.; Muhle, H. *Phytochemistry* 1996, 43, 629.
- (174) Egli, S.; Gfeller, H.; Bigler, P.; Schlunegger, U. P. *European Journal of Forest Pathology* 1988, 18, 351.
- (175) Borg-Karlson, A.-K.; Norin, T.; Talvitie, A. *Tetrahedron* 1981, 37, 425.
- (176) Elmar, K.; Günther, K.; Gert, V. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2002, 47, 393.
- (177) Dale, J. A.; Mosher, H. S. *Journal of the American Chemical Society* 1973, 95, 512.

- (178) Habel, A.; Spiteller, D.; Boland, W. *Journal of Chromatography A* 2007, *1165*, 182.
- (179) König, W. A.; Rieck, A.; Saritas, Y.; Hardt, I. H.; Kubeczka, K.-H. *Phytochemistry* 1996, *42*, 461.
- (180) Charles, P. C.; Narsimha, R.; David, N. L.; Wyllie, S. G. *Flavour and Fragrance Journal* 2000, *15*, 352.
- (181) Warmers, U.; König, W. A. *Phytochemistry* 1999, *52*, 99.
- (182) Adio, A. M.; Paul, C.; Kloth, P.; König, W. A. *Phytochemistry* 2004, *65*, 199.
- (183) Fehr, C.; Galindo, J. *Angewandte Chemie International Edition* 2006, *45*, 2901.
- (184) Fürstner, A.; Hannen, P. *Chemistry a European Journal* 2006, *12*, 3006.
- (185) König, W. A.; Bülow, N.; Saritas, Y. *Flavour and Fragrance Journal* 1999, *14*, 367.
- (186) Andersen, N. H.; Bissonette, P.; Liu, C. B.; Shunk, B.; Ohta, Y.; Tseng, C.-L. W.; Moore, A.; Huneck, S. *Phytochemistry* 1977, *16*, 1731.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
amu	„atomic mass unit“
atm	physikalische Atmosphäre
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
Mbp	Megabasenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CAPS	<i>N</i> -Cyclohexyl-3-aminopropansulfonsäure
cDNA	„copy DNA“
CoA	Coenzym A
CPM	„counts per minute“
Da	Dalton
DMADP	Dimethylallyldiphosphat
DMAP	4-(Dimethylamino)-pyridin
DME	Ethylenglykoldimethylether
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>ee</i>	„enantiomeric excess“
FDP	Farnesyldiphosphat
FID	Flammenionisationsdetektor
FPLC	„Fast Protein Liquid Chromatography“
<i>g</i>	Schwerebeschleunigung
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GGDP	Geranylgeranyldiphosphat
HLDAH	„horse liver alcohol dehydrogenase“
IDP	Isopentenylidiphosphat
IS	interner Standard
IT	Ionenspur
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
k_{cat}	Wechselzahl
mRNA	„messenger RNA“

MOPS	3-(<i>N</i> -Morpholino)-propansulfonsäure
MOPSO	3-(<i>N</i> -Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure
MtTPS	<i>Medicago truncatula</i> Terpensynthase
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NDP	Nerolidyldiphosphat
OD	optische Dichte
OPP	Diphosphat ($P_2O_7^{3-}$)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“
PDB	Proteindatenbank
PTFE	Polytetrafluorethylen („Teflon“)
Rt	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPME	„solid phase micro extraction“
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
THF	Tetrahydrofuran
TIC	„total ion current“
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
WT	Wildtyp
v/v	Volumen zu Volumen
m/m	Gewicht zu Gewicht

8.2 Daten zur Identifizierung der Enzymprodukte

8.2.1 Retentionsindizes

Tabelle A-1. Retentionsindizes der Enzymprodukte, die in der Gegenwart verschiedener Substrate von MtTPS5 (WT) bzw. MtTPS5 Y526F gebildet wurden, im Vergleich zu authentischen Referenzen (genaue Bedingungen: siehe Experimentellen Teil). Die Herkunft der Referenzsubstanzen ist ebenfalls angegeben.

Enzymprodukt	Retentionsindex			Herkunft der Referenz
	WT	Y526F	Referenz	
(2E,6E)-Produkte				
Bicycloelemen (86)	n. d.	1339	1339	BT
α -Cubeben (50)	1351	1351	1351	Fluka
α -Copaen (51)	1377	1376	1377	Fluka
β -Cubeben (52)	1391	1390	1391	(a)
(E)- β -Caryophyllen (53)	1419	1419	1419	Fluka
β -Copaen (54)	1430	1428	1430	(a)
Cadina-3,5-dien (55)	1451	--- ^a	1451	(b) ¹⁷¹
α -Humulen (56)	1454	1454	1454	Fluka
<i>allo</i> -Aromadendren (57)	1461	1461	1461	Fluka
<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-dien (58)	1474	1474	1474	(b) ¹⁷¹
γ -Muurolen (59)	1477	1477	1478	(a)
Germacren D (34)	1481	1482	1481	(a)
Bicyclosesquiphellandren (60)	1492	1492	1492	(a)
Bicyclogermacren (61)	1496	1496	1497	MA ¹⁷⁹
α -Muurolen (62)	1500	1500	1500	(a)
δ -Amorphen (63)	1507	n. d.	---	(c) ¹⁷²
Cubebol (64)	1516	1516	1517	(d)

δ -Cadinen (65)	1525	1524	1525	(b) ¹⁷¹
Cadina-1,4-dien (66)	1533	1533	1534	(b) ¹⁷¹
Copan-3-ol (67)	1573	1573	---	n. r.
4 α -Hydroxygermacra-1(10),5-dien (68)	1577	1577	1577	MO
Copaborneol (69)	1608	1608	---	n. r.
1- <i>epi</i> -Cubenol (70)	1629	n. d.	1629	(b) ¹⁷¹
T-Cadinol (71)	1642	n.d.	1642	MO
Cubenol (72)	1642	n. d.	1643	(b) ¹⁷¹
Torreyol (73)	1647	1649	1647	(e) ¹⁷⁴
Kunzeaol (74)	1691	1691	---	i. a. MS ¹⁸⁰
C ₁₅ H ₂₄ O-I (75)	1694	1694	---	n. r.
(2Z,6E)-Produkte				
α -Ylangen (89)	1371	1370	1370	Givaudan
α -Himachalen (90)	1447	1448	1448	SU
Isobicyclogermacren (91)	1476	---	---	n. r.
α -Amorphen (92)	1479	1480	1480	SU
γ -Humulen (93)	1486	1485	1485	Fluka
γ -Himachalen (94)	1487	1486	1487	Givaudan
β -Himachalen (95)	1500	1500	1500	SU
δ -Amorphen (63)	1507	1507	1507	(c) ¹⁷²
C ₁₅ H ₂₆ O-II (96)	1515	---	---	n. r.
C ₁₅ H ₂₆ O-III (97)	1571	---	---	n. r.
Humulan-6,9-dien-3-ol (98)	1576	---	---	n. r.
C ₁₅ H ₂₆ O-IV (99)	1632	---	---	n. r.
2-Himachalen-7-ol (100)	1648	1646	1646	Givaudan
NDP-Produkte				
(E)- β -Farnesen (87)	1456	1457	1457	Givaudan

(<i>E,E</i>)- α -Farnesen (88)	1506	1507	1507	Givaudan
Nerolidol (48)	1562	1562	1562	Roth

MA: *Meum athamanticum*¹⁷⁹ (a); **BT:** *Bazzania tribolata* (a)¹⁸¹; **MO:** *Melissa officinalis* Öl (<http://www.kobashi.com>); **SU:** *Scapania undulata* (a)¹⁸²; **(a):** Stefan von Reuß (Universität Hamburg); **(b):** säurekatalysierte Umlagerung von α -Cubeben (**50**); **(c):** säurekatalysierte Umlagerung von Germacren D (**34**); **(d):** synthetische Probe wurde freundlicherweise bereitgestellt von C. Fehr¹⁸³ und A. Fürstner¹⁸⁴; **(e):** *Cortinarius odorifer* Britz¹⁷⁴ (bereitgestellt von S. Egli, Birmensdorf, Schweiz); **n. d.:** nicht detektiert; **n. r.:** keine Referenz verfügbar, **i. a. MS** identifiziert anhand des MS-Spektrum; ^akoeluiert mit α -Humulen (**56**), ^bkoeluiert mit γ -Muurolen (**59**), ^ckoeluiert mit T-Cadinol (**71**).

8.2.2 Stereochemische Analyse

Tabelle A-2. Gaschromatische Trennungsfaktoren (α -Werte) und Auflösung (R-Werte), Herkunft der Referenzen, sowie die Elutionsreihenfolge und die Trennbedingungen der Bestimmung der Absolutkonfiguration der MtTPS1- und MtTPS5-Produkte.

Enzymprodukt	α -Wert	R-Wert	Herkunft der Referenz	Elutionsreihenfolge, Trennbedingungen
(2E,6E)-Produkte				
α -Cubeben (50)	1,0084	1,497	(a)	¹⁸⁵ , (e)
α -Copaen (51)	1,0077	1,609	(a)	¹⁸⁵ , (f)
β -Cubeben (52)	1,0052	1,117	PQ + (-)- 52 ((a))	¹⁸⁵ , (e)
(E)- β -Caryophyllen (53)	1,0141	3,352	(a)	¹⁸⁵ , (e)
β -Copaen (54)	1,0118	2,705	PQ + (-)- 54 ((a))	¹⁸⁵ , (e)
Cadina-3,5-dien (55)	1,0262	6,795	PQ + EE	(b), (e)
<i>allo</i> -Aromadendren (57)	1,0469	13,197	(a)	¹⁸⁵ , (e)
γ -Muurolen (59)	1,0258	6,870	(\pm)- 34 Umlagerung ¹⁷²	¹⁸⁵ , (e)
Germacren D (34)	1,0128	3,593	(a)	¹⁸⁵ , (e)
Bicyclosquisphellandren (60)	1,0451	11,466	PQ + EE	(b), (e)
Bicyclogermacren (61)	1,0080	2,287	PQ + MA ((a)) ¹⁷⁹	¹⁸⁵ , (e)
α -Muurolen (62)	1,0106	3,071	(a)	¹⁸⁵ , (e)
Cubebol (64)			Umlagerung zu δ -Cadinen (65)	
δ -Cadinen (65)	1,0239	9,016	(\pm)- 51 Umlagerung ¹⁷¹	¹⁸⁵ , (e)
Cadina-1,4-dien (66)	1,0260	9,481	(\pm)- 34 Umlagerung ¹⁷²	¹⁸⁵ , (e)
Copan-3-ol (67)			Dehydratisiert zu α -Copaen (51)	
Torreyol (73)	1,0283	2,094	EE + (+)- 73 ¹⁷⁴	(c), (g)

(2Z,6E)-Produkte				
(+)- α -Ylangen (89)	1,0103	2,058	EZ + (-)- 89 ^a	¹⁸⁵ , (e)
(-)- α -Himachalen (90)	1,0266	5,939	SU + (-)- 90 ^b	(d), (e)
(-)- α -Amorphen (92)	1,0365	9,996	EZ + (-)- 92 ^b	¹⁸⁵ , (e)
(-)- γ -Himachalen (94)	1,0169	3,998	SU + (-)- 94 ^b	(d), (e)
(+)- δ -Amorphen (63)	1,0205	5,509	(\pm)- 34 Umlagerung ¹⁷²	¹⁸⁵ , (e)

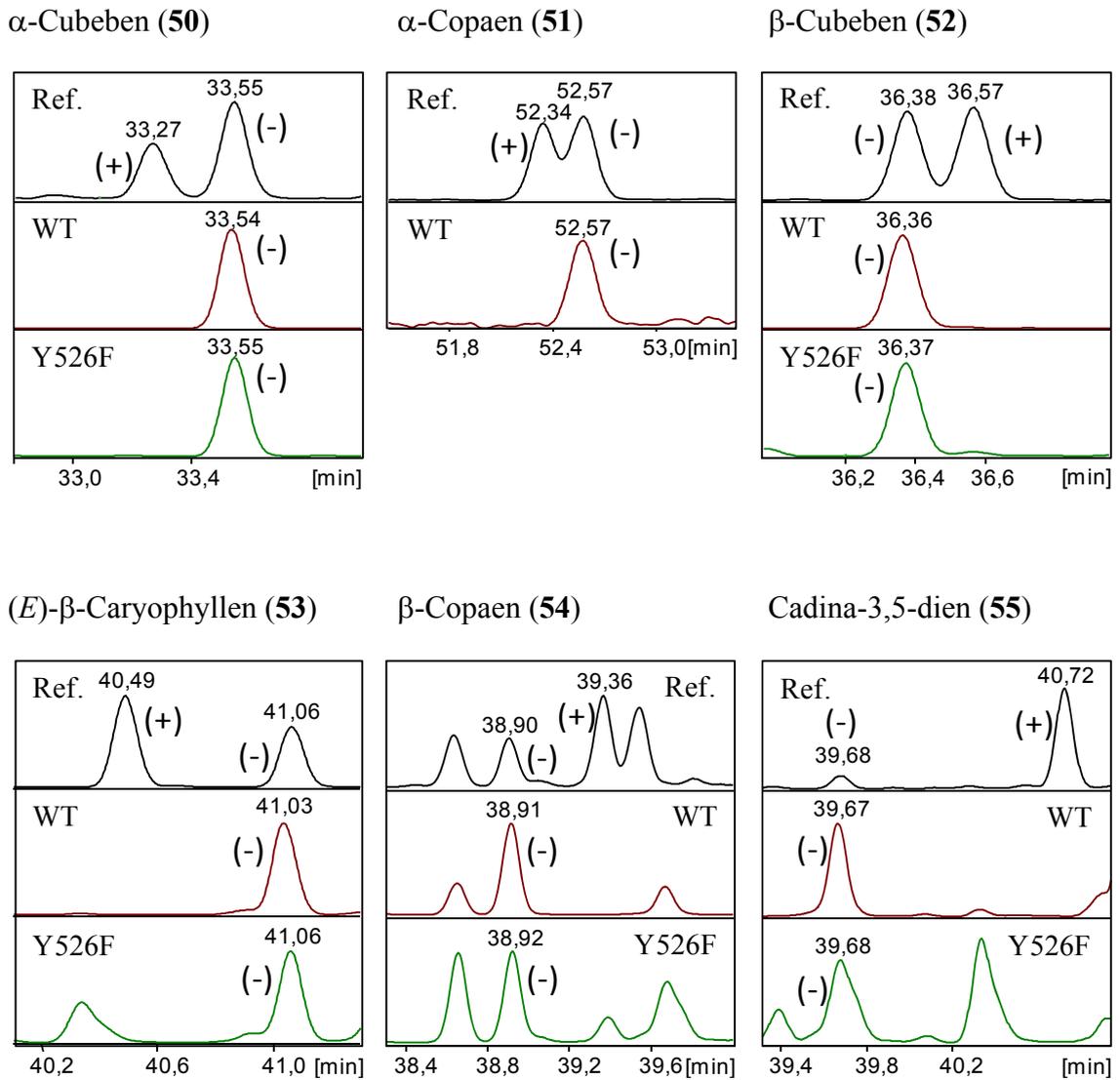
PQ: *Preissia quadrata* Pentanextrakt; **MA:** *Meum athamanticum* (a); **SU:** *Scapania undulata* (a)¹⁸²; **EE:** MtTPS5 inkubiert mit (2E,6E)-FDP (**22**) (Pentanextrakt); **EZ:** MtTPS5 inkubiert mit (2Z,6E)-FDP (**76**) (Pentanextrakt); **(a):** Stefan von Reuss (Universität Hamburg); **(b):** *Preissia quadrata* enthält (+)-Isomer; **(c):** *Cortinarius odorifer* Britz enthält (+)-**73**; **(d)** *Scapania undulata* enthält (+)-Enantiomer;¹⁸⁶ **(e):** Methode I; **(f):** Methode II; **(g):** Methode III (Methoden: siehe Experimentellen Teil). ^aStefan von Reuss (Universität Hamburg), ^bGivaudan SA, Schweiz

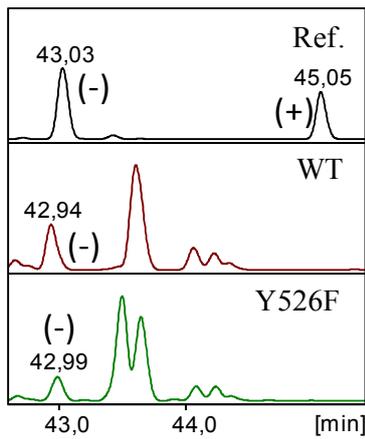
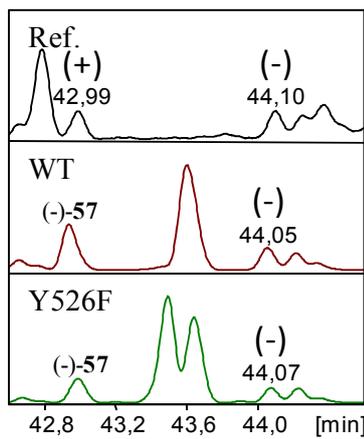
Tabelle A-3. Gaschromatische Trennungsfaktoren (α -Werte) und Auflösung (R-Werte), Herkunft der Referenzen, sowie die Elutionsreihenfolge und die Trennbedingungen der chiralen Trennungen der MtTPS3-Produkte.

Enzymprodukt	α -Wert	R-Wert	Herkunft der Referenz	Elutionsreihenfolge, Trennbedingungen
MtTPS3-Produkte				
Linalool (46)	1,0239	3,087	Sigma	¹³² , (a)
Nerolidol (48)	1,0076	2,352	Synthese (diese Arbeit)	¹³² , (b)
Geranylinalool (49)	1,0077	0,597	Sigma	JO, (c)

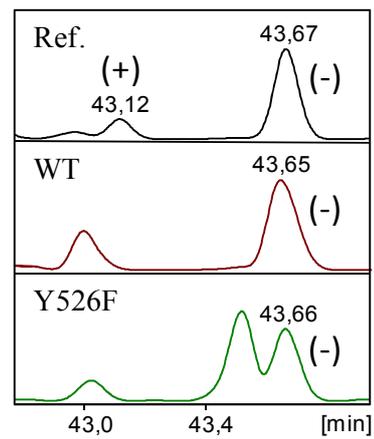
JO: Jasmin Öl (<http://www.dragonspice.de>, enthält (3S)-Enantiomer)¹; **(a)** Methode IV, **(b)** Methode V, **(c)** Methode VI (Methoden: siehe Experimentellen Teil).

Abbildung A-1. Identifizierung der absoluten Konfiguration von den Produkten die durch Inkubationen vom MtTPS5 (WT) und MtTPS5 Y526F mit (2*E*,6*E*)-FDP (**22**) erhalten wurden. Ref.: Referenz die beide Enantiomere enthält.

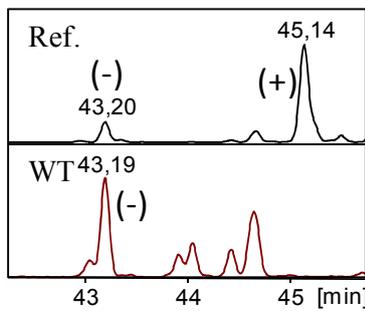


allo-Aromadendren (57) γ -Muurolen (59)

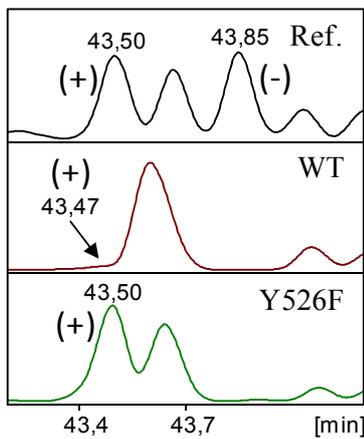
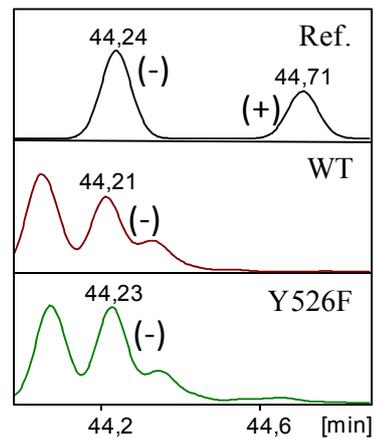
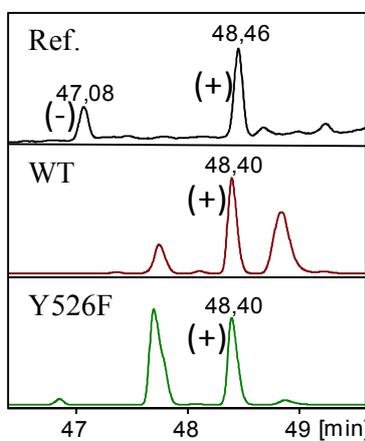
Germacren D (34)



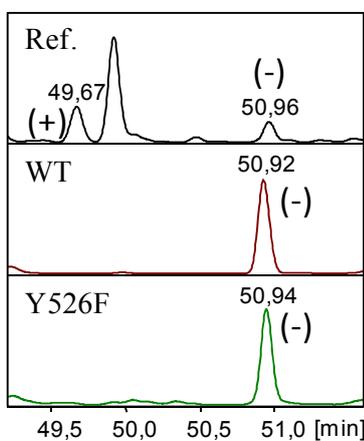
Bicyclosquiphellan. (60)



Bicyclogermacren (61)

 α -Muurolen (62) δ -Cadinen (65)

Cadina-1,4-dien (66)



Torreyol (73)

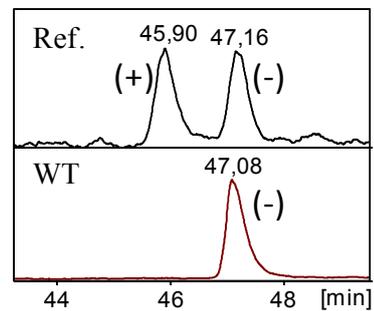
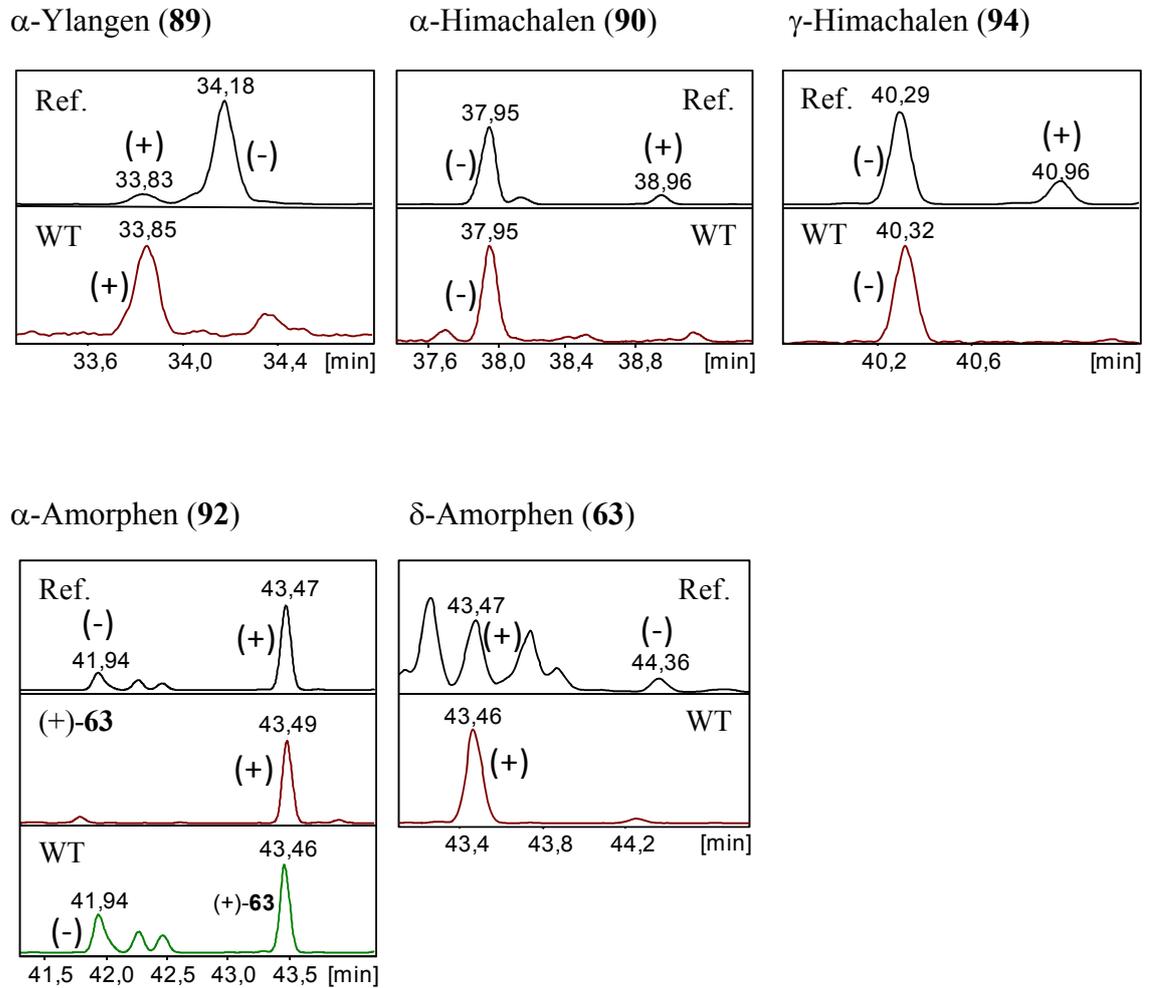


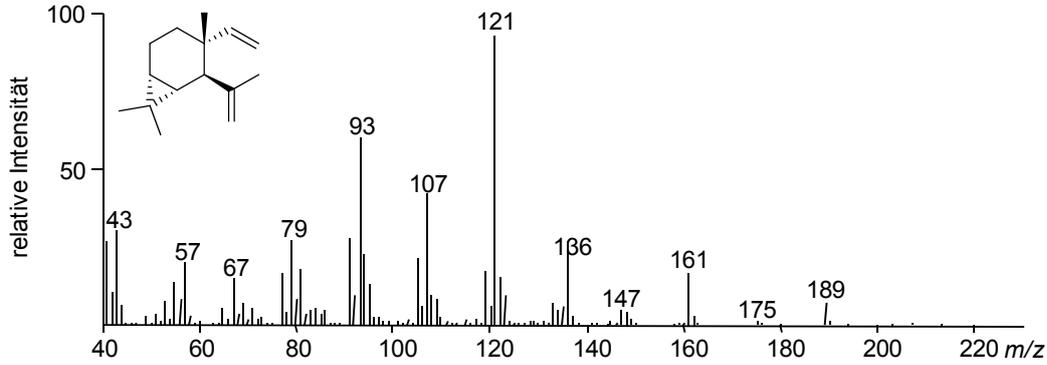
Abbildung A-2. Identifizierung der absoluten Konfiguration von den Produkten die durch Inkubationen von MtTPS5 mit (2*Z*,6*E*)-FDP (**76**) erhalten wurden. Ref.: Referenz die beide Enantiomere enthält.



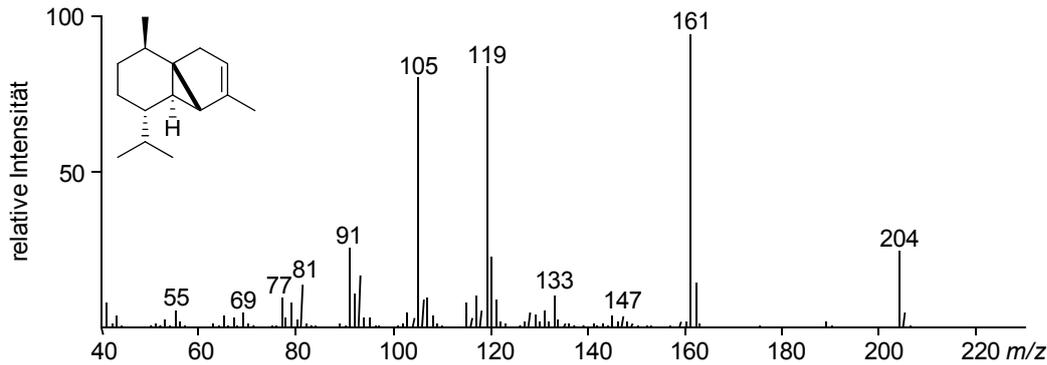
8.2.3 Massenspektren

Abbildung A-3. Die Massenspektren der Enzymprodukte von MtTPS5 nach Inkubation mit verschiedenen FDP- und NDP-Substraten. Die Verbindungen sind nach aufsteigendem Retentionsindex geordnet.

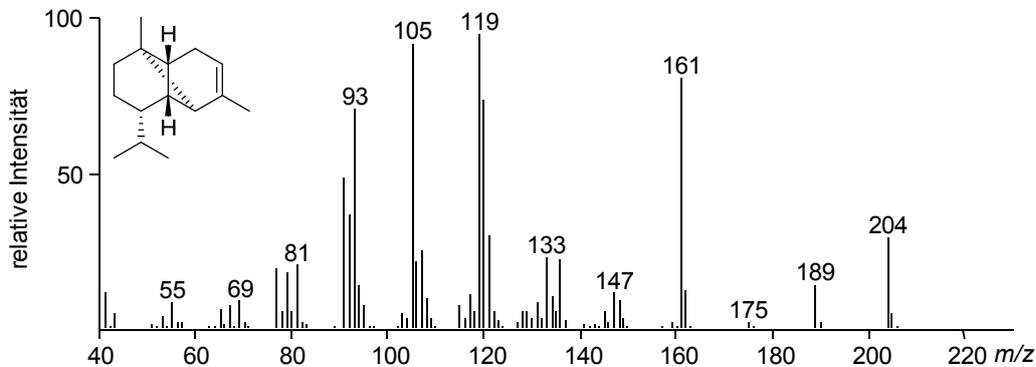
Bicycloelemen (**86**) (RI = 1339)

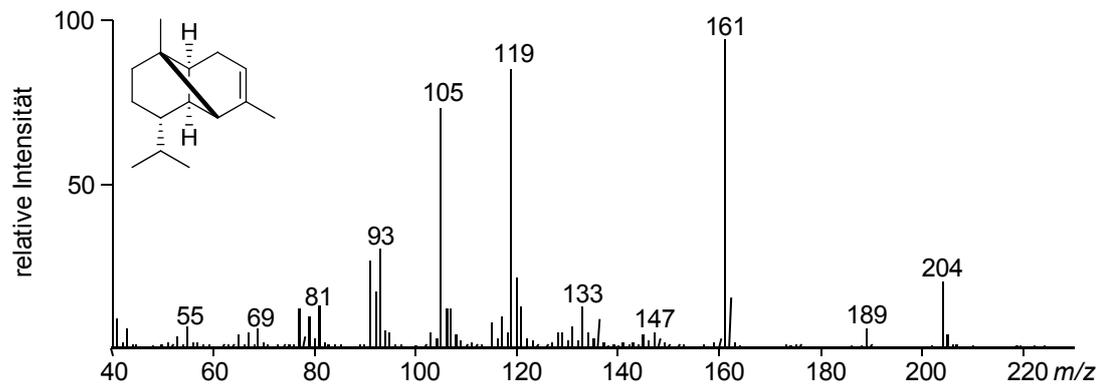
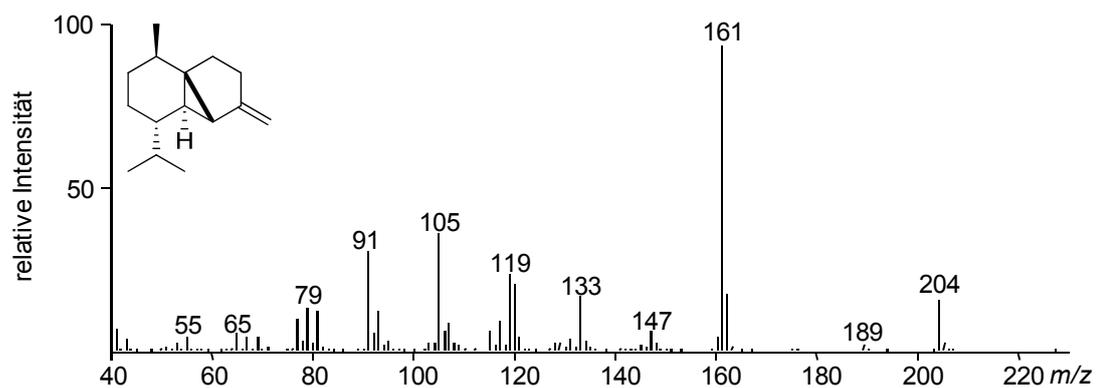
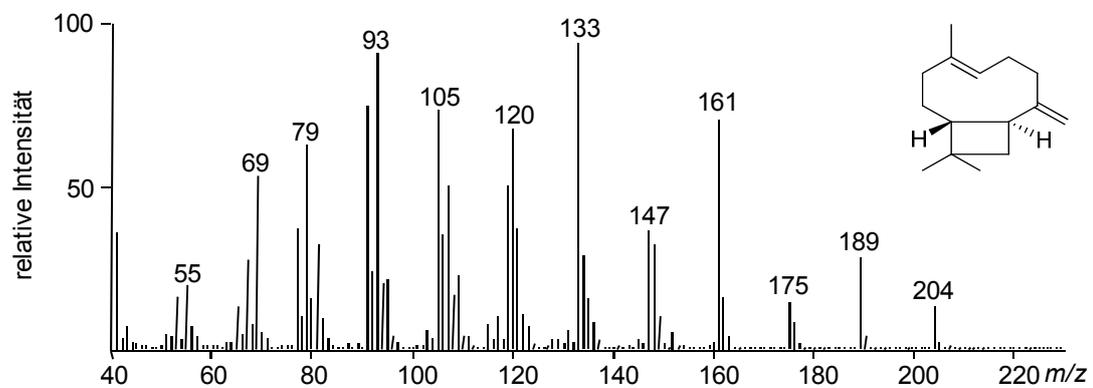


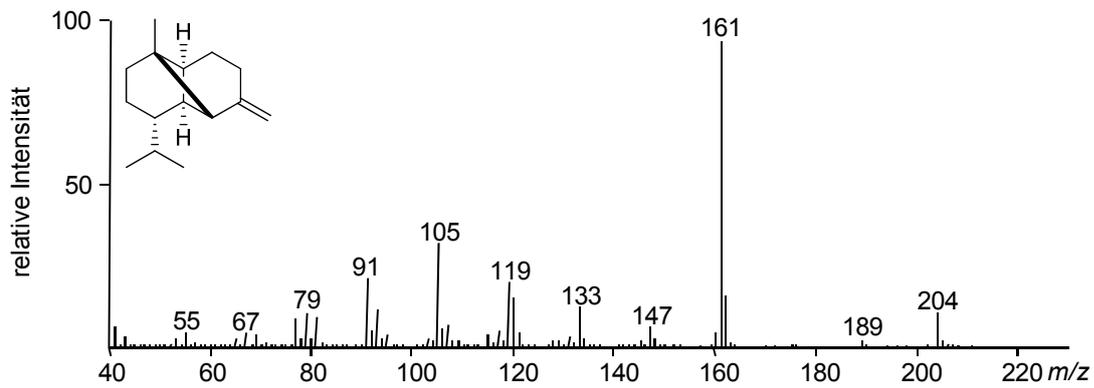
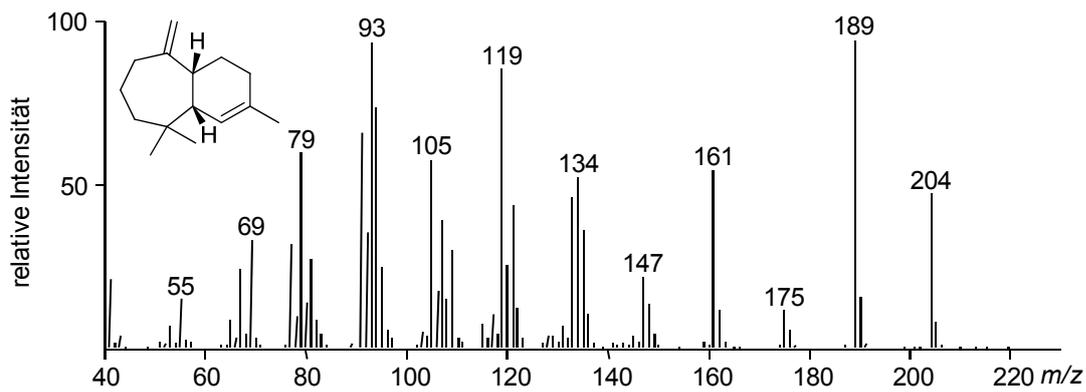
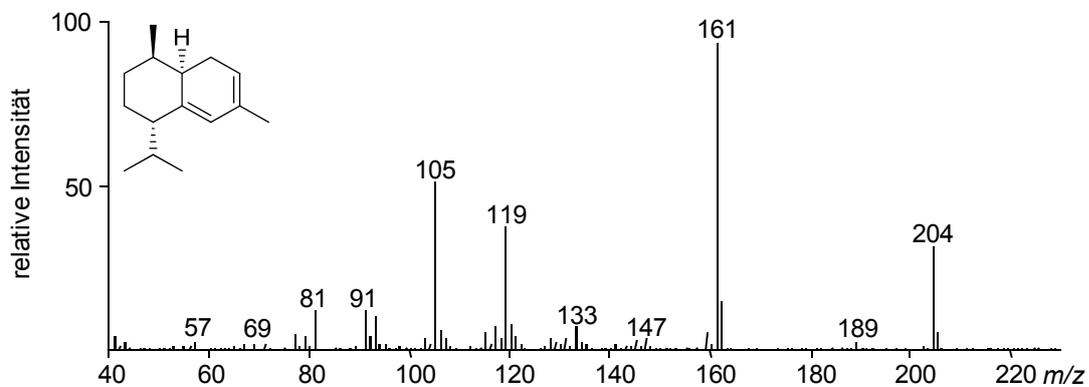
α -Cubeben (**50**) (RI = 1351)

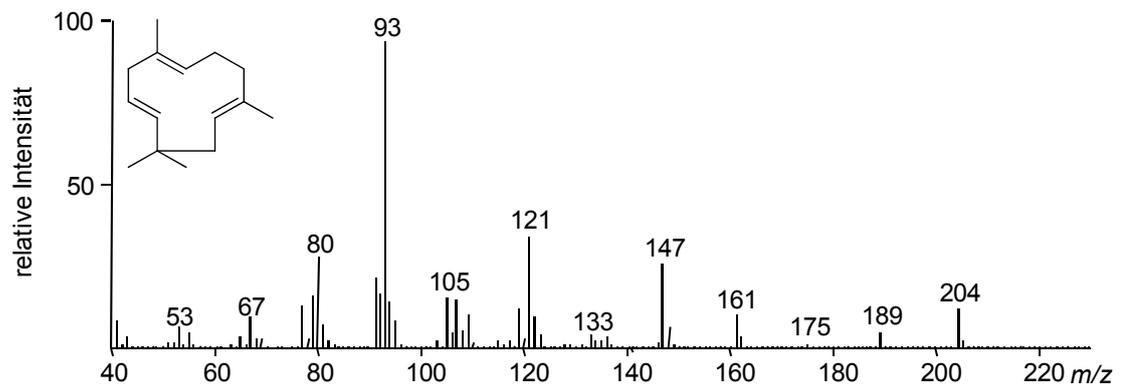
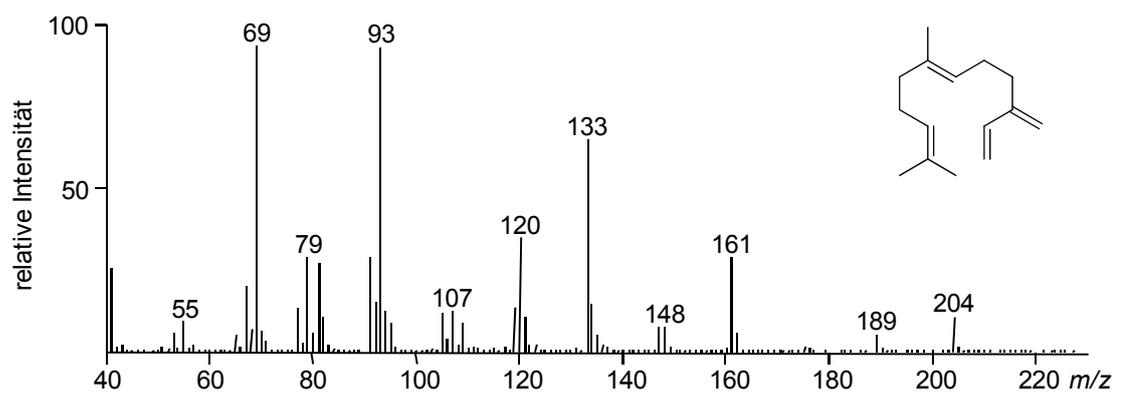
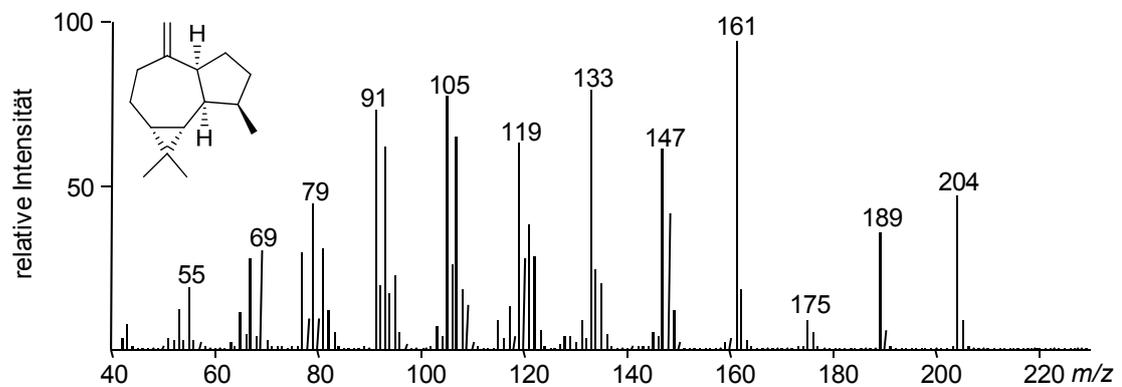


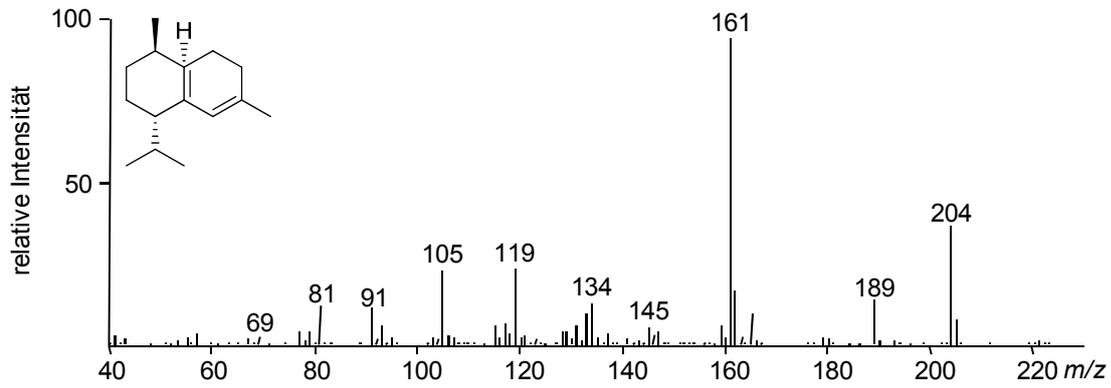
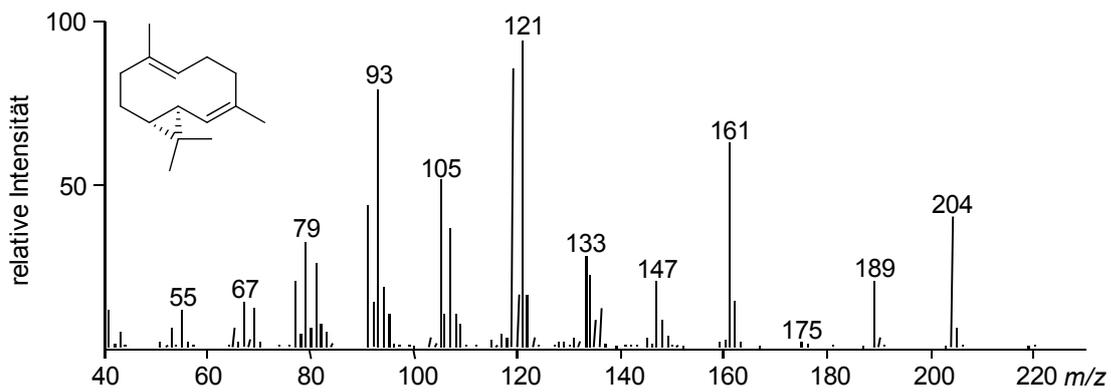
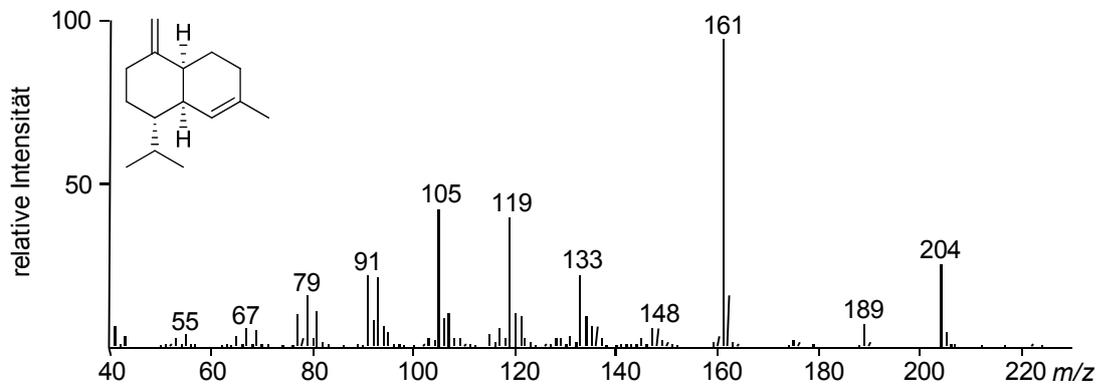
α -Ylangen (**89**) (RI = 1371)

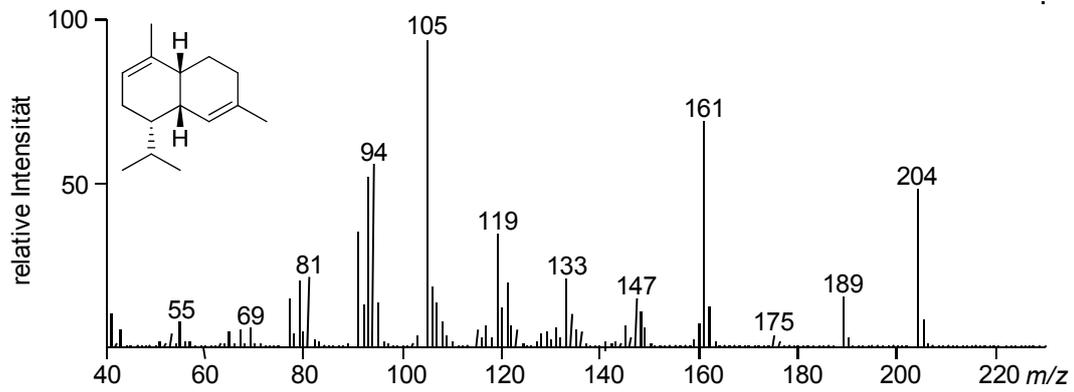
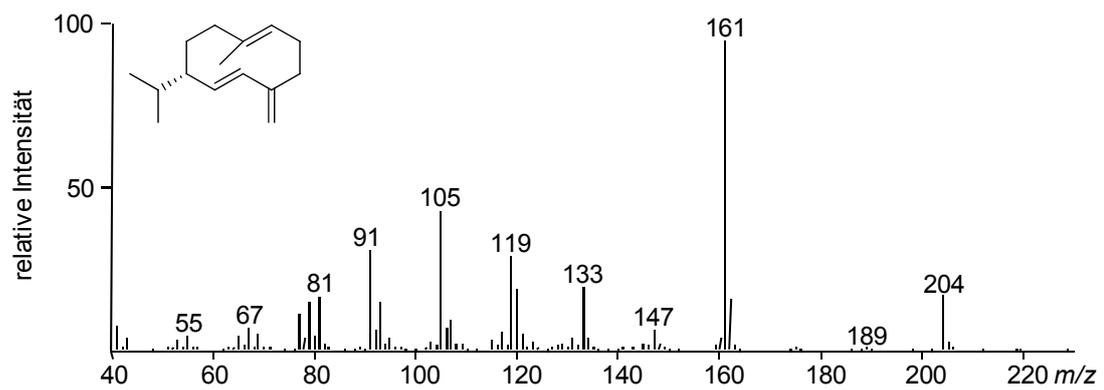
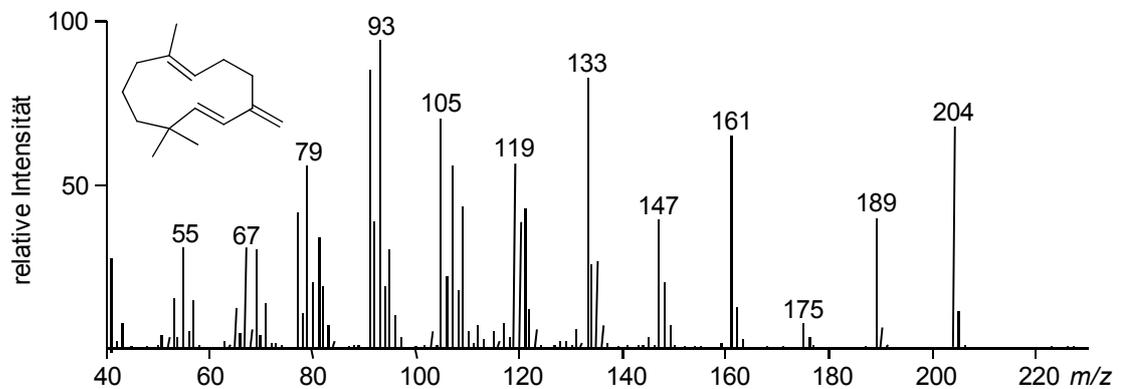


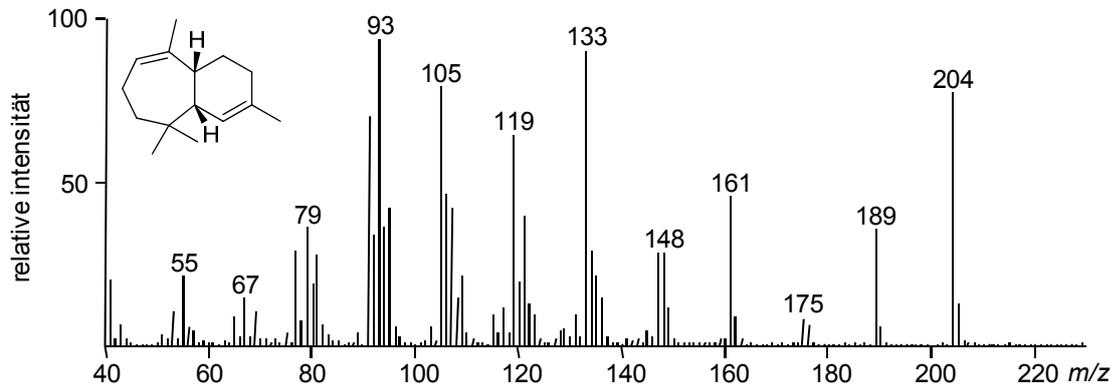
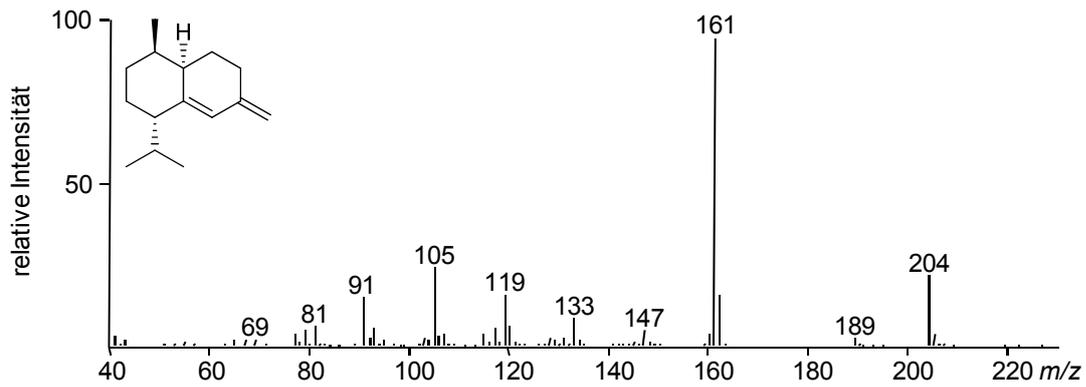
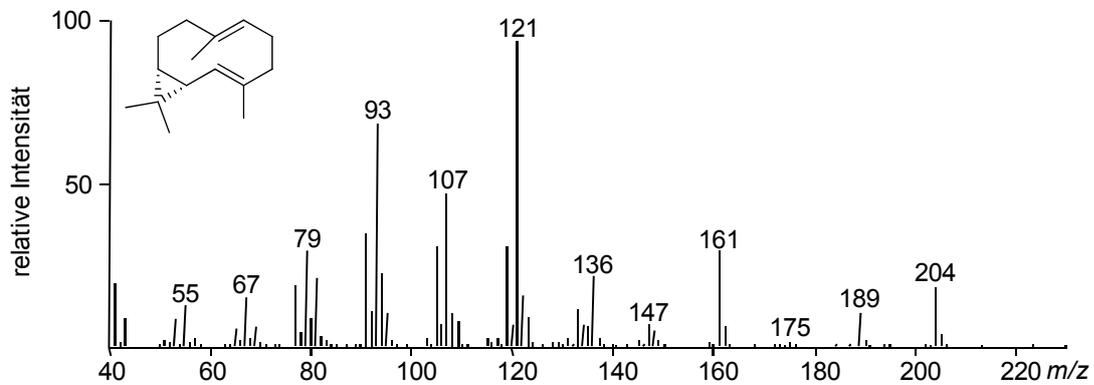
α -Copaen (**51**) (RI = 1377) β -Cubeben (**52**) (RI = 1391)*(E)*- β -Caryophyllen (**53**) (RI = 1419)

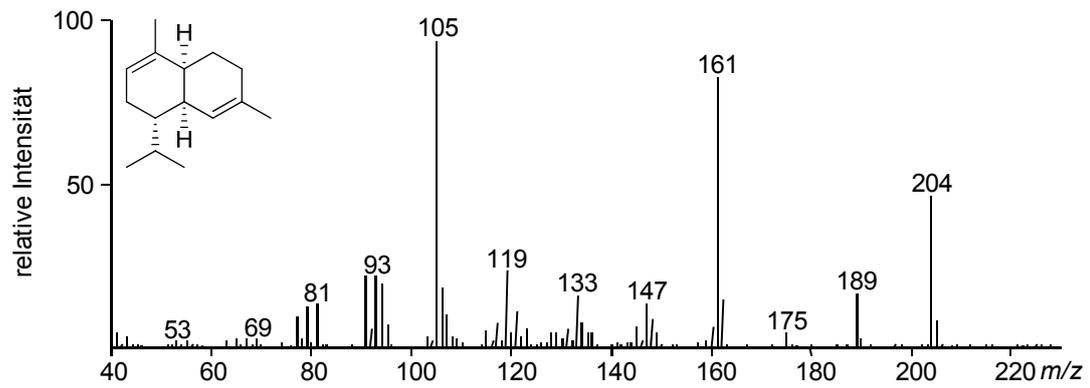
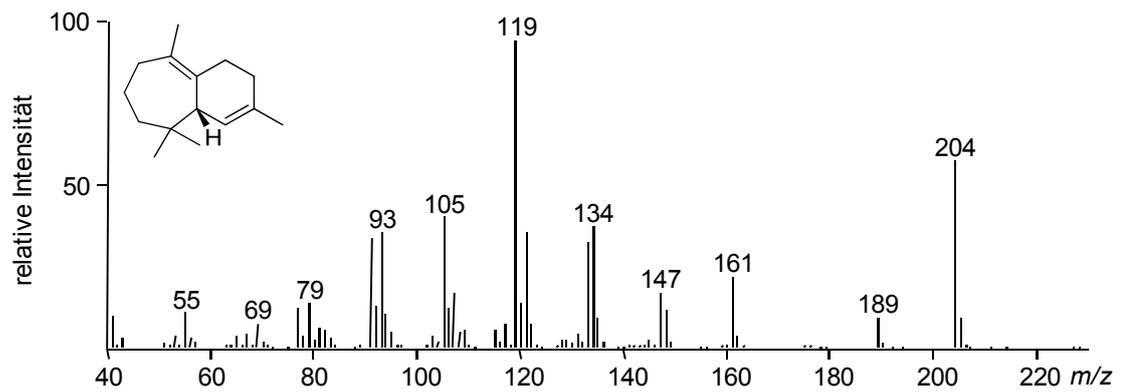
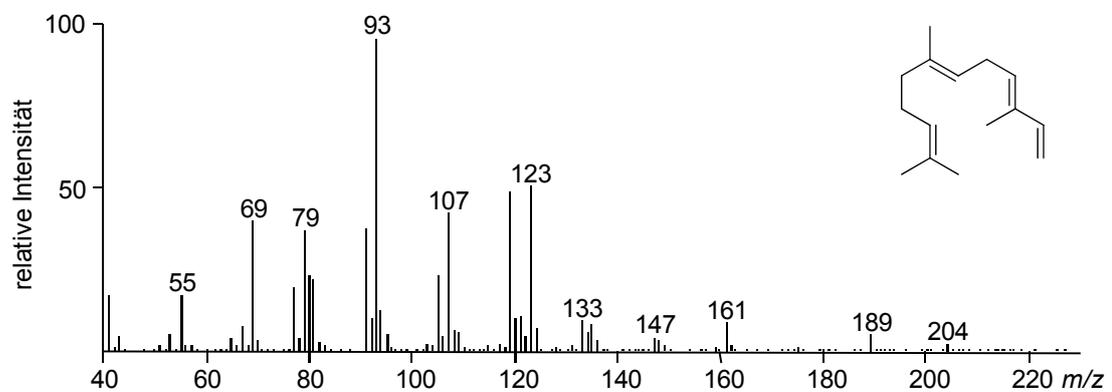
β -Copaen (**54**) (RI = 1430) α -Himachalen (**90**) (RI = 1447)Cadina-3,5-dien (**55**) (RI = 1451)

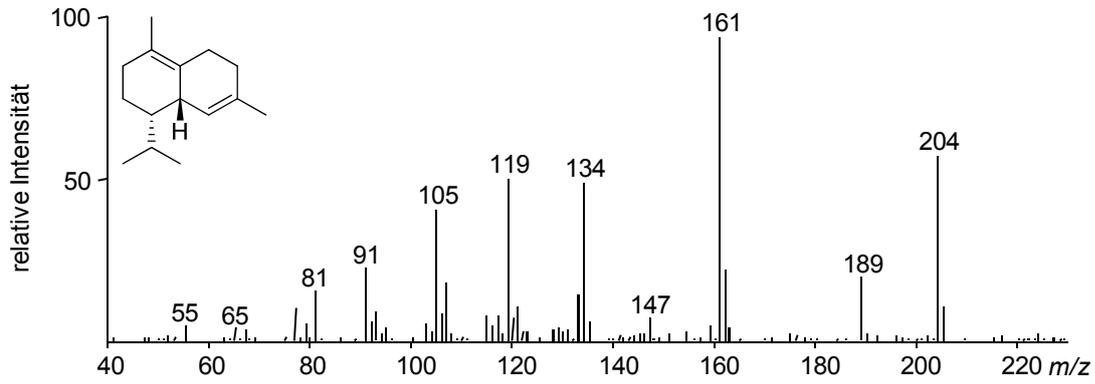
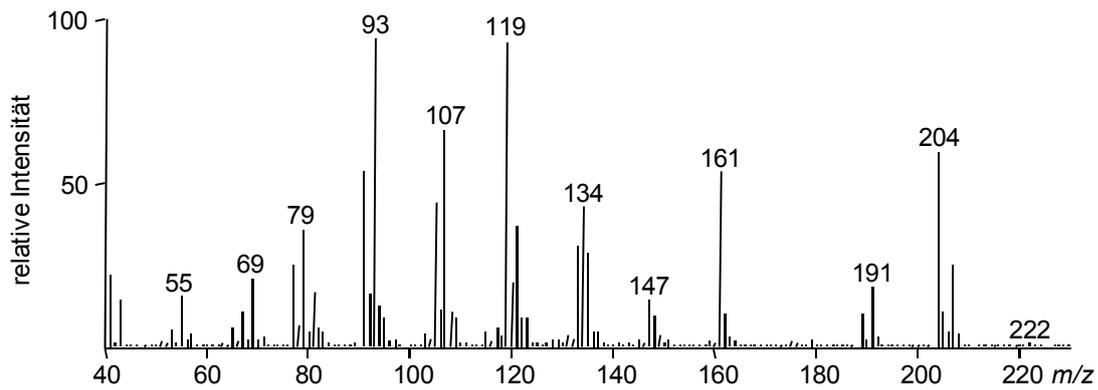
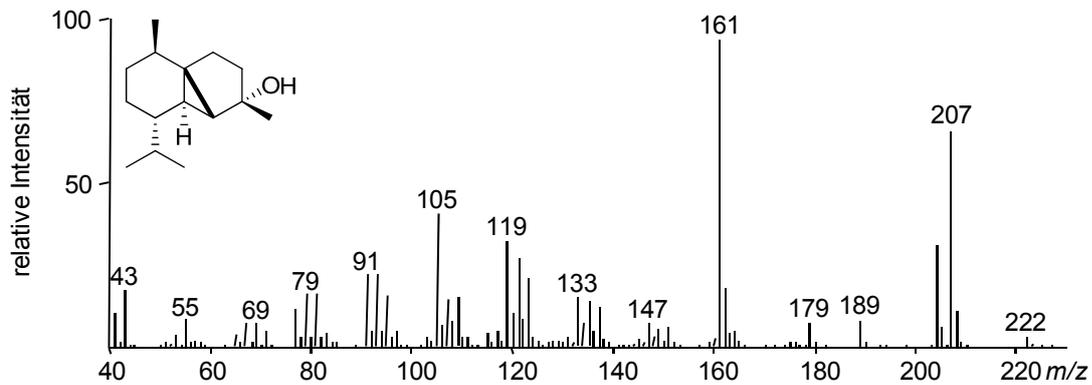
α -Humulen (**56**) (RI = 1454)*(E)*- β -Farnesen (**87**) (RI = 1456)*allo*-Aromadendren (**57**) (RI = 1461)

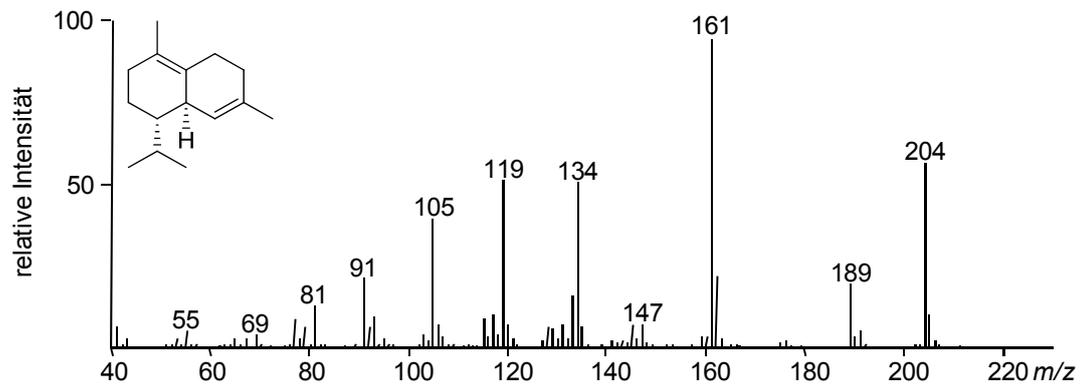
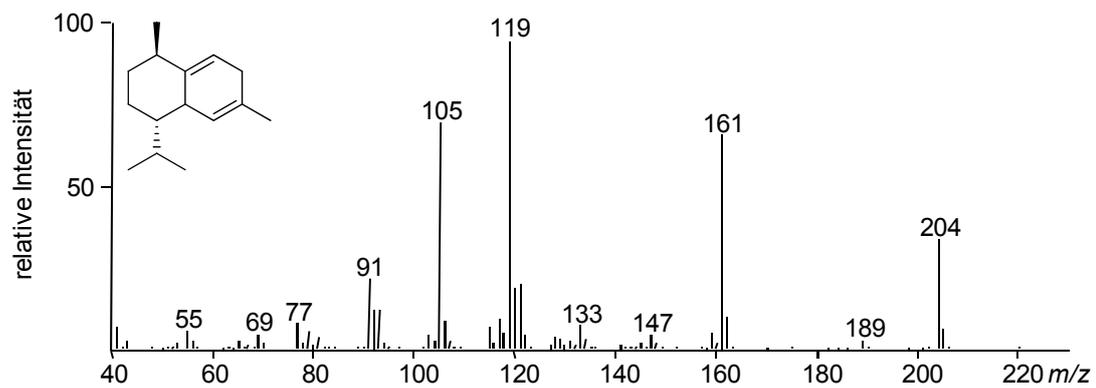
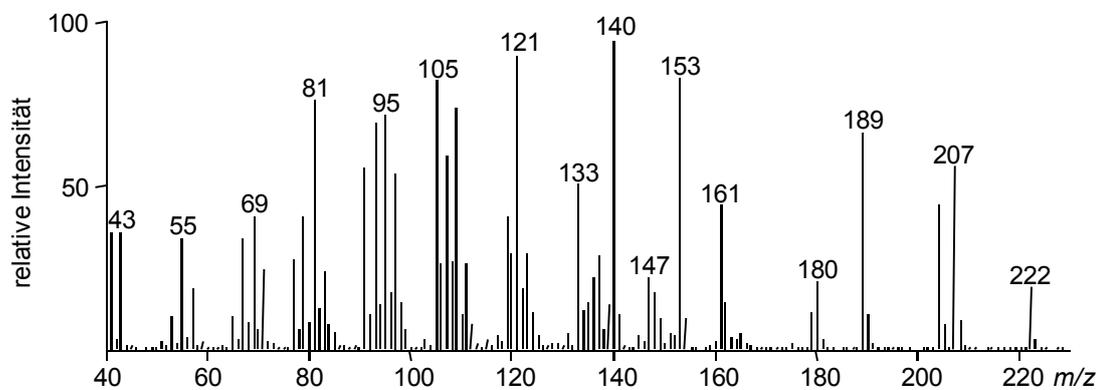
trans-Cadina-1(6),4-dien (**58**) (RI = 1474)Isobicyclogermacren (**91**) (RI = 1476) γ -Muurolen (**59**) (RI = 1477)

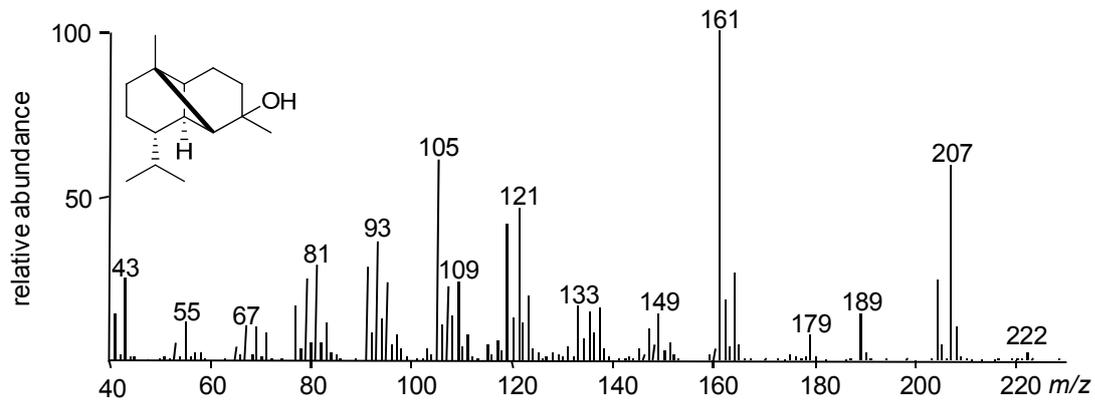
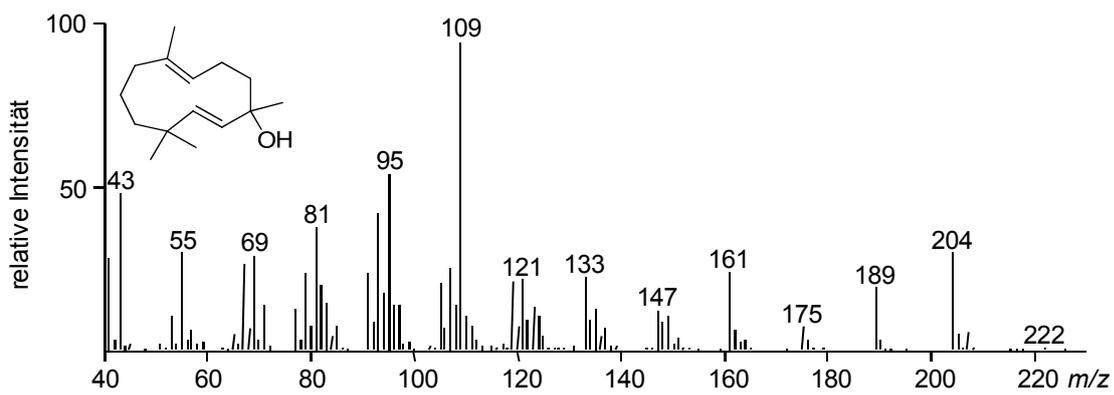
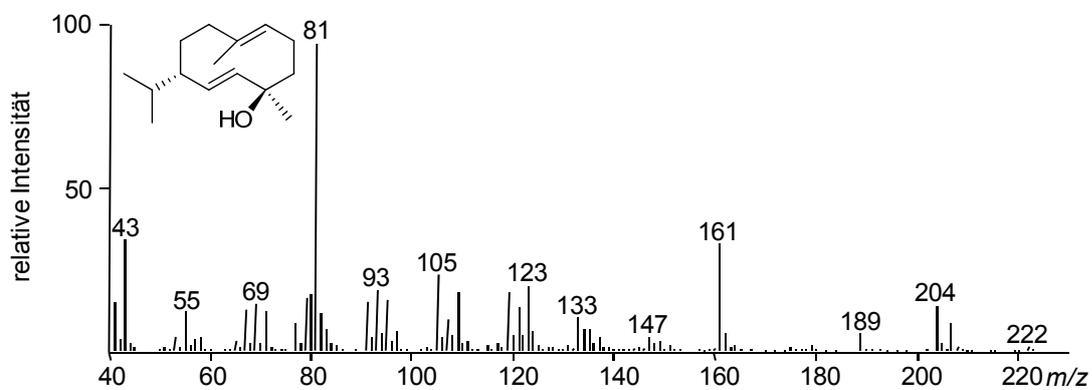
α -Amorphen (**92**) (RI = 1479)Germacren D (**34**) (RI = 1481) γ -Humulen (**93**) (RI = 1486)

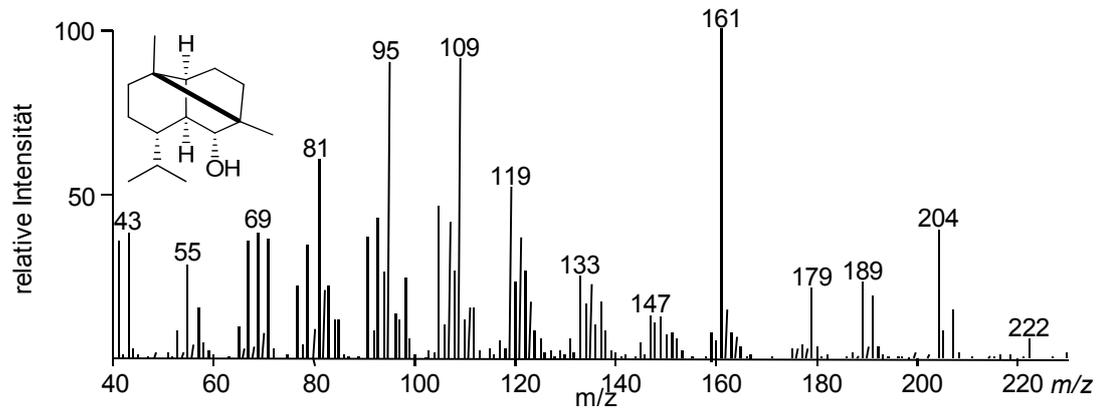
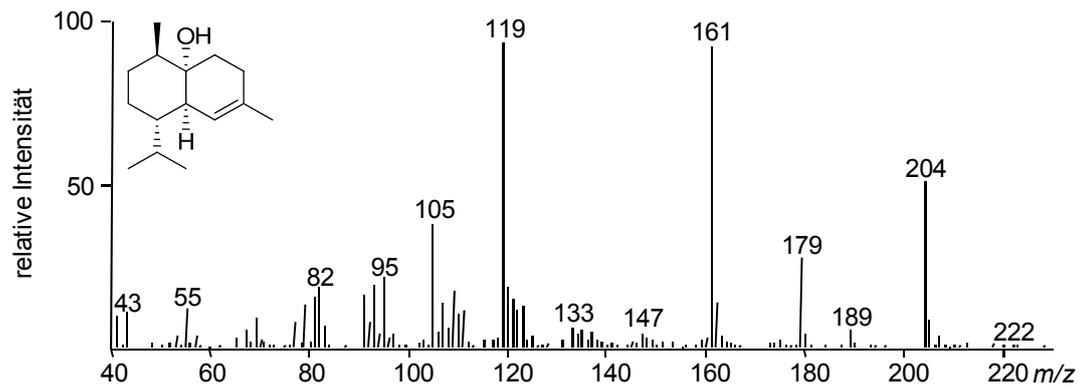
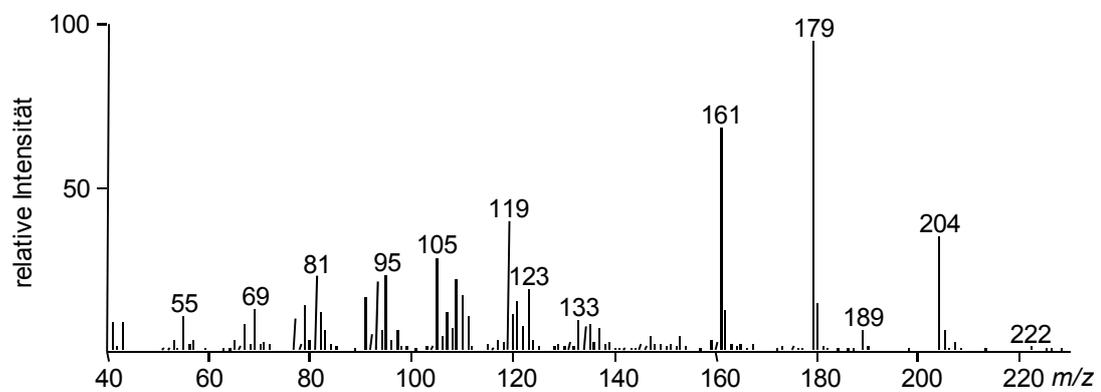
γ -Himachalen (**94**) (RI = 1486)Bicyclosesquiphellandren (**60**) (RI = 1492)Bicyclogermacren (**61**) (RI = 1496)

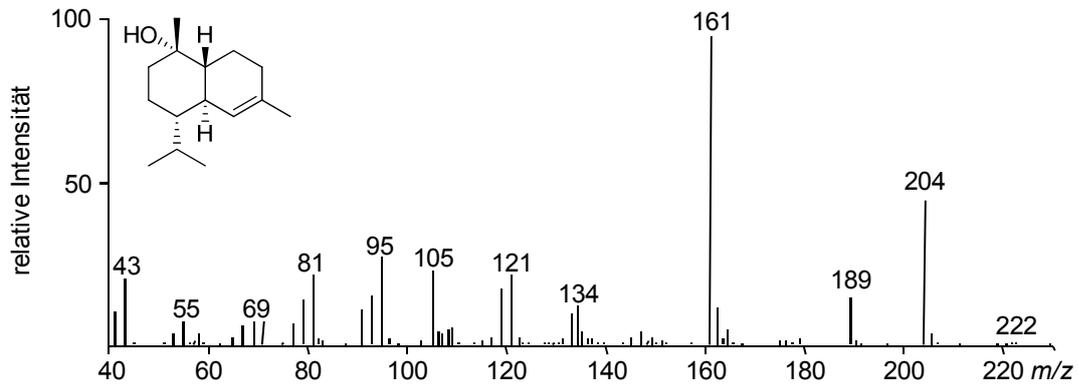
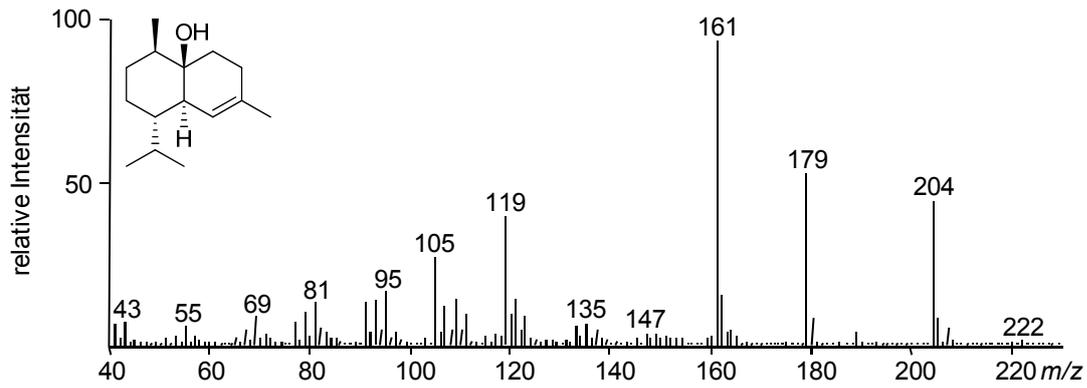
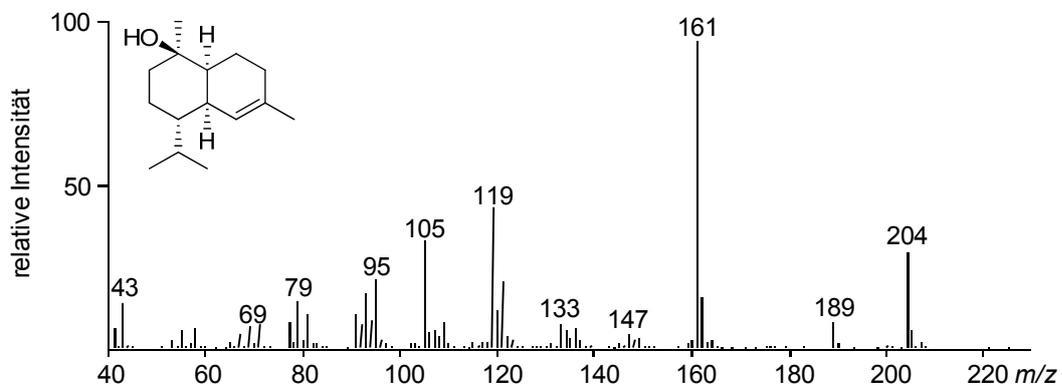
α -Muurolen (**62**) (RI = 1500) β -Himachalen (**95**) (RI = 1500)*(E,E)*- α -Farnesen (**88**) (RI = 1506)

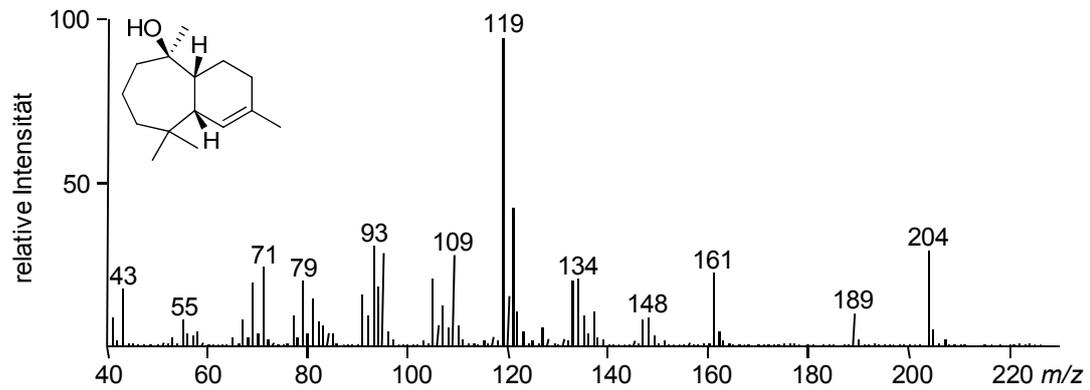
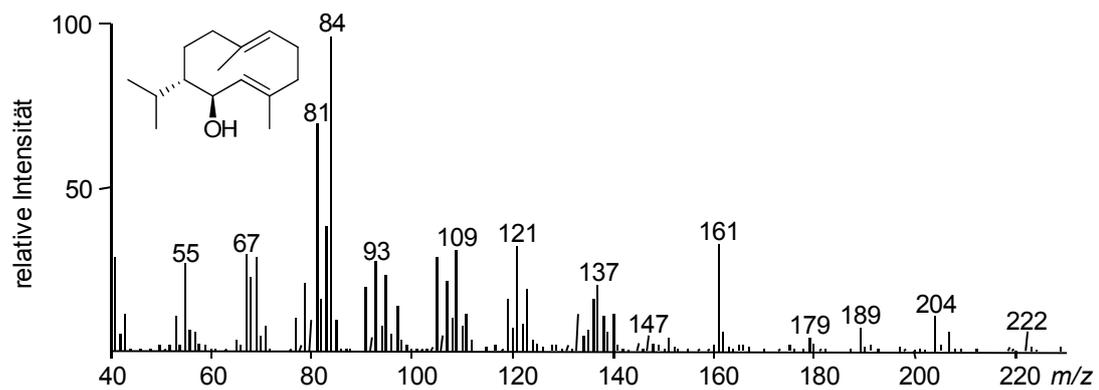
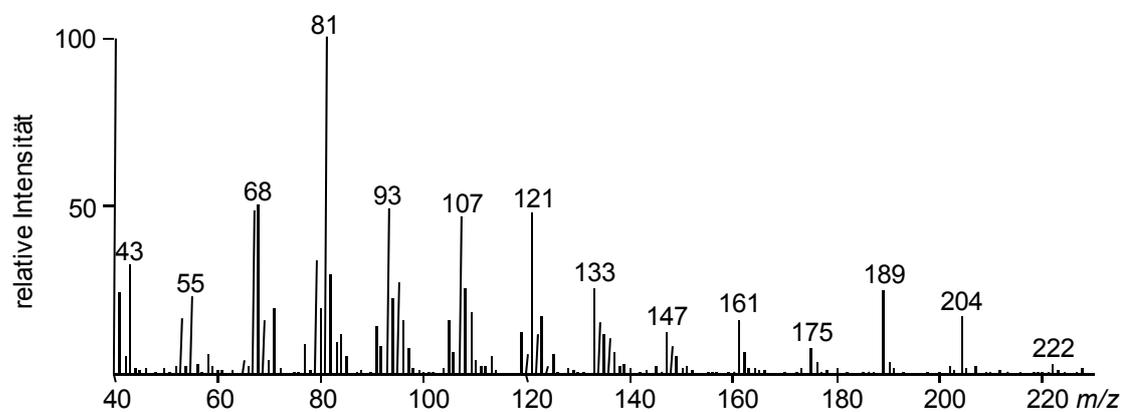
δ -Amorphen (**63**) (RI = 1507) $C_{15}H_{26}O$ -II (**96**) (RI = 1515)Cubebol (**64**) (RI = 1516)

δ -Cadinen (**65**) (RI = 1525)Cadina-1,4-dien (**66**) (RI = 1533) $C_{15}H_{26}O$ -III (**97**) (RI = 1571)

Copan-3-ol (**67**) (RI = 1573)Humulan-6,9-dien-3-ol (**98**) (RI = 1576)4 α -Hydroxygermacra-1(10),5-dien (**68**) (RI = 1577)

Copaborneol (**69**) (RI = 1608)1-*epi*-Cubenol (**70**) (RI = 1629)C₁₅H₂₆O-IV (**99**) (RI = 1632)

T-Cadinol (**71**) (RI = 1642)Cubenol (**72**) (RI = 1642)Torreyol (**73**) (RI = 1647)

2-Himachalen-7-ol (**100**) (RI = 1648)Kunzeaol (**74**) (RI = 1691) $C_{15}H_{24}O$ -I (**75**) (RI = 1694)

8.3 Daten von D₂O-Markierungsexperimenten

Tabelle A-4. Deuteriumgehalt der Enzymprodukte nach Inkubation von MtTPS5 (WT) bzw. MtTPS5 Y526F in schweren Wasser (> 99 Atom-% D). Die Mittelwerte und Standardabweichungen basieren auf vier unabhängigen Experimenten.

	Deuteriumgehalt (%-d ₁)	
	Wildtyp	Y526F-Mutante
Cadalan (4,10-Dimethyl-7-isopropyl octaline)		
α -Cubeben (50)	92 ± 1	29 ± 4
α -Copaen (51)	92 ± 1	30 ± 6
β -Cubeben (52)	74 ± 1	24 ± 3
β -Copaen (54)	60 ± 3	11 ± 3
α -Humulen (56) + Cadina-3,5-dien (55) ^{a,b}	33 ± 2	-5 ± 10
<i>trans</i> -Cadina-1(6),4-dien (58)	90 ± 2	n. d.
α -Muurolen (59) + Germacren D (34)	19 ± 4	1 ± 2
Bicyclosesquiphellandren (60)	73 ± 5	n. d.
α -Muurolen (62)	91 ± 1	2 ± 5
δ -Amorphen (63)	3 ± 4	n.d.
Cubebol (64)	88 ± 2	n.d.
δ -Cadinen (65)	84 ± 1	4 ± 1
Cadina-1,4-dien (66)	91 ± 1	11 ± 5
Copan-3-ol (67)	90 ± 2	n.d.
Copaborneol (69)	92 ± 3	n.d.
1- <i>epi</i> -Cubenol (70)	82 ± 6	n.d.
T-Cadinol (71) + Cubenol (72)	38 ± 6	n.d.
Torreyol (73)	92 ± 1	7 ± 7

Germacrane		
α -Muurolen (59) + Germacren D (34) ^b	19 ± 4	1 ± 2
4 α -Hydroxygermacra-1(10),5-dien (68)	8 ± 4	1 ± 1
Kunzeaol (74) + C ₁₅ H ₂₆ O-I(75) ^{a,b}	-2 ± 12	n.d.
Aromadendrane / Bicyclogermacrane		
<i>allo</i> -Aromadendren (57)	98 ± 0	64 ± 4
Bicyclogermacren (61) ^a	11 ± 10	0 ± 1
Caryophyllane / Humulane		
(<i>E</i>)- β -Caryophyllen (53)	16 ± 2	8 ± 8
α -Humulen (56) + Cadina-3,5-dien (55) ^{a,b}	33 ± 2	-5 ± 10
unbekannte Verbindungen		
Kunzeaol (74) + C ₁₅ H ₂₆ O-I (75) ^{a,b}	-2 ± 12	n.d.

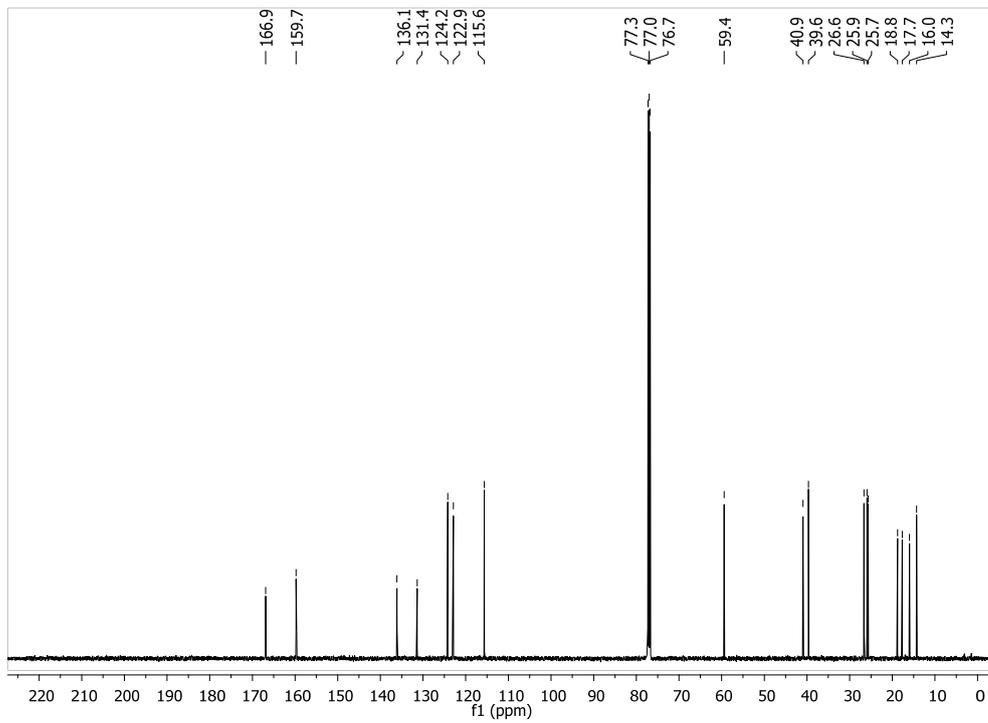
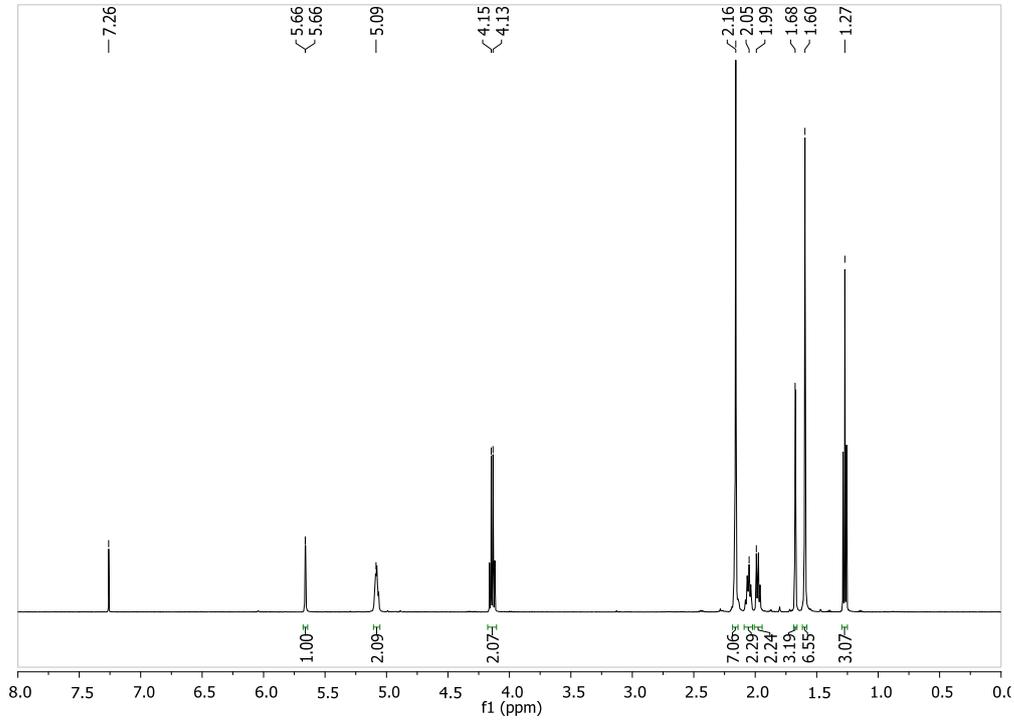
^aNegative Werte und/oder hohe Standardabweichungen resultieren aus der geringen Konzentration der entsprechenden Produkte (<0,5 %), wodurch der Einfluss des Hintergrundes auf die berechneten Werte stark zunimmt.

^bDer Wert repräsentiert die Summe der Markierungsgrade beider koeluiierenden Substanzen.

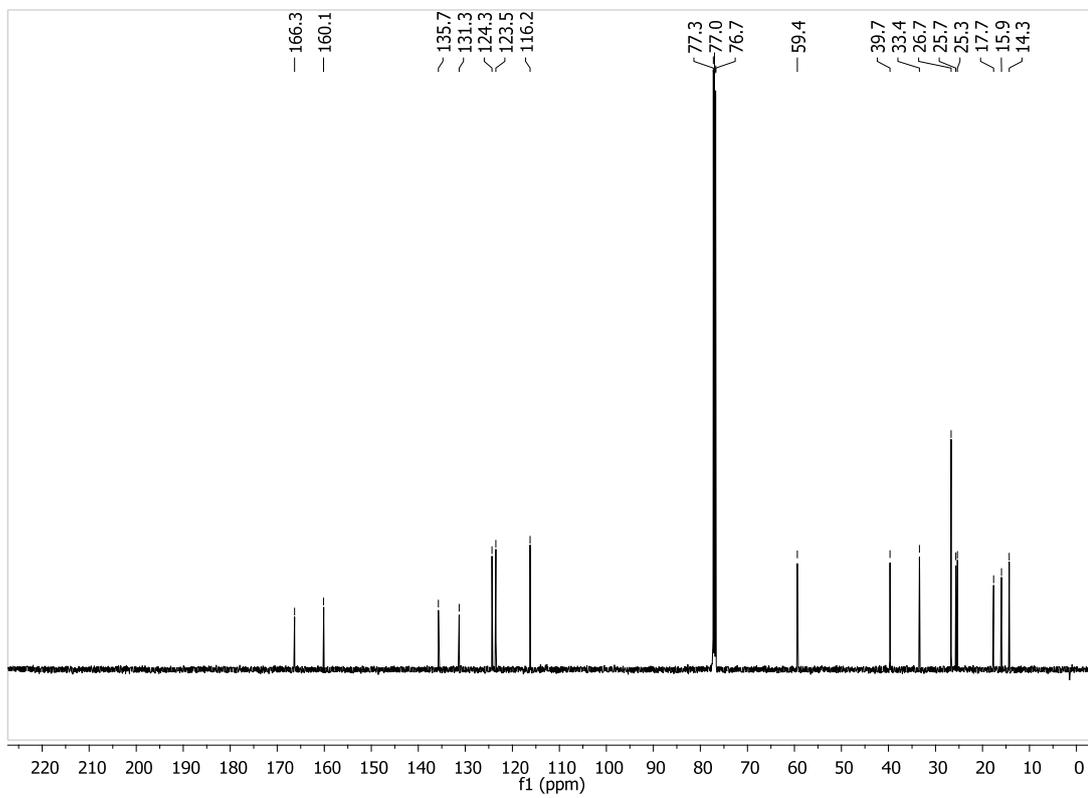
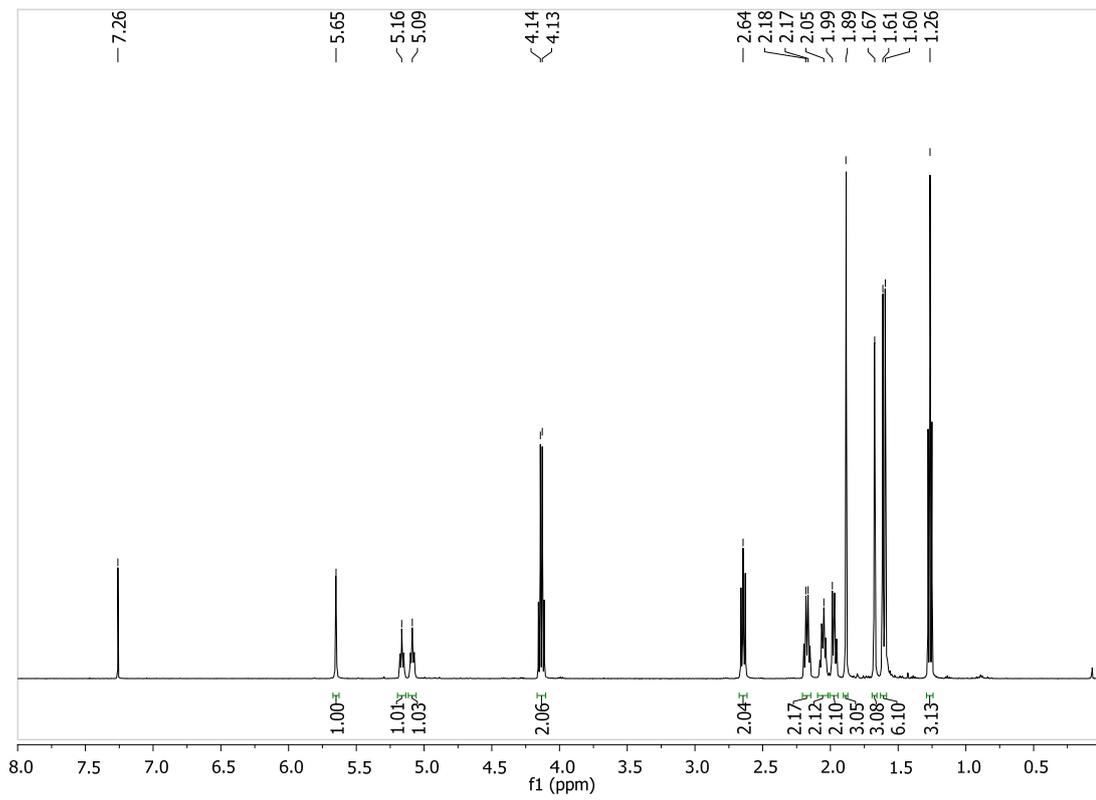
8.4 Synthesedaten

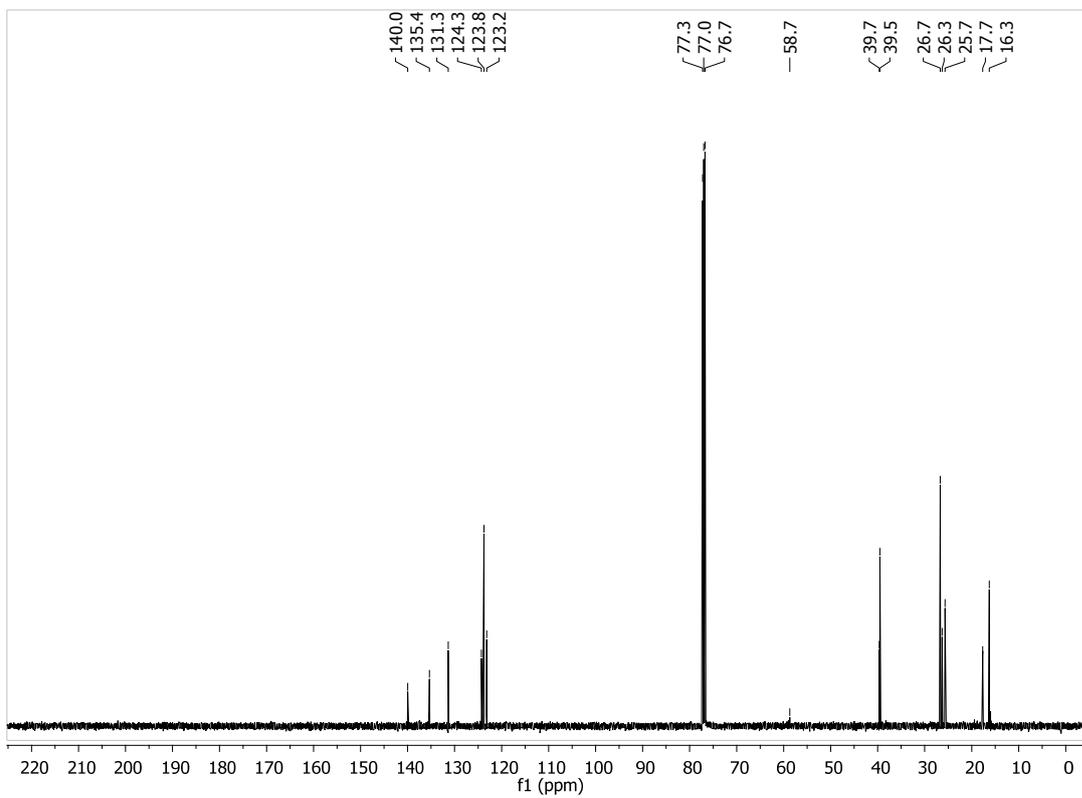
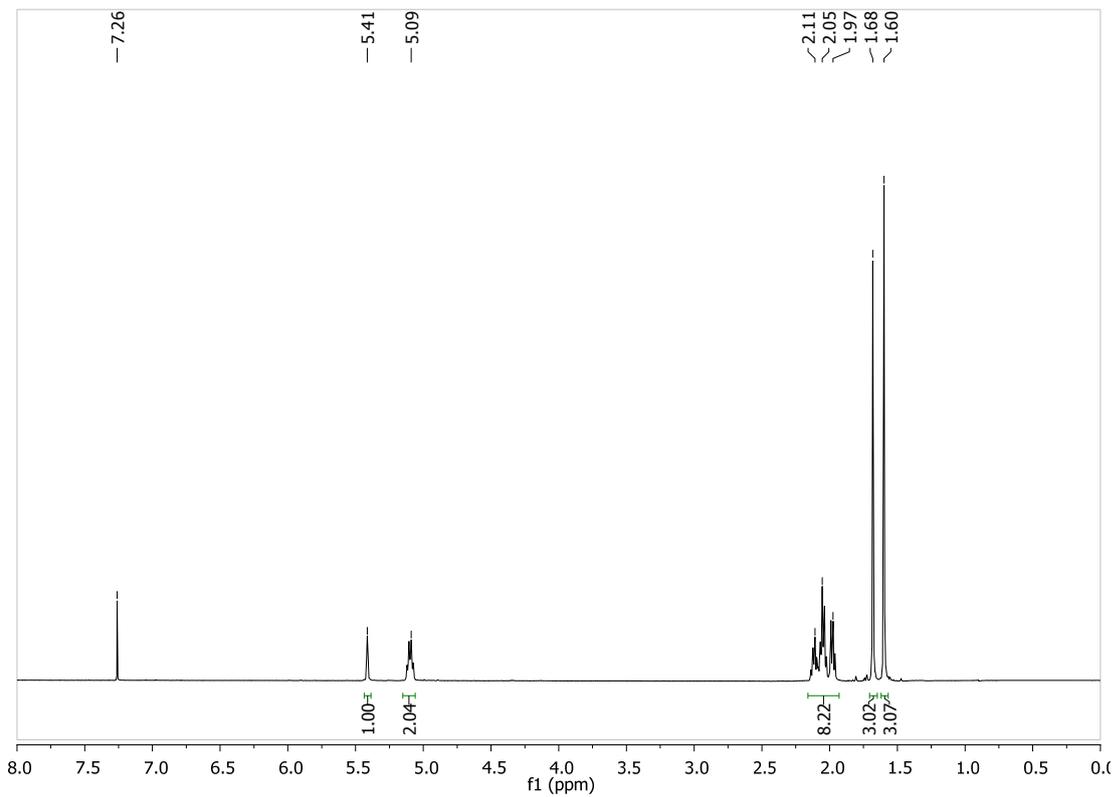
8.4.1 ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren

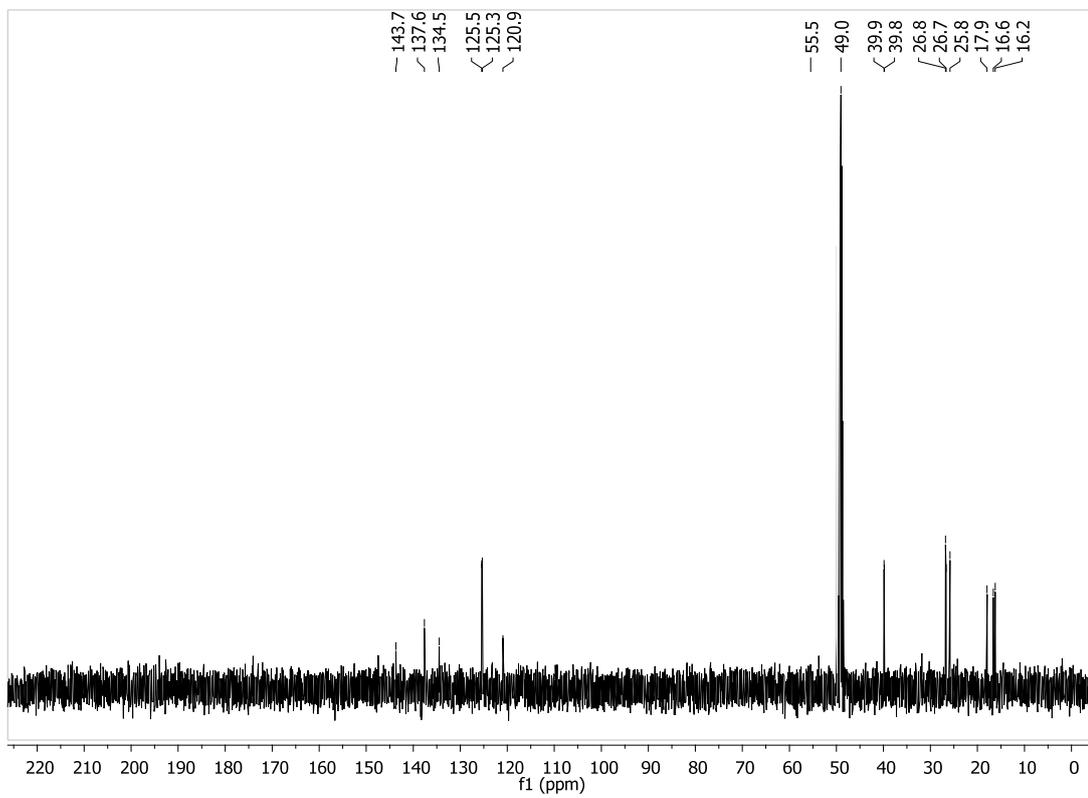
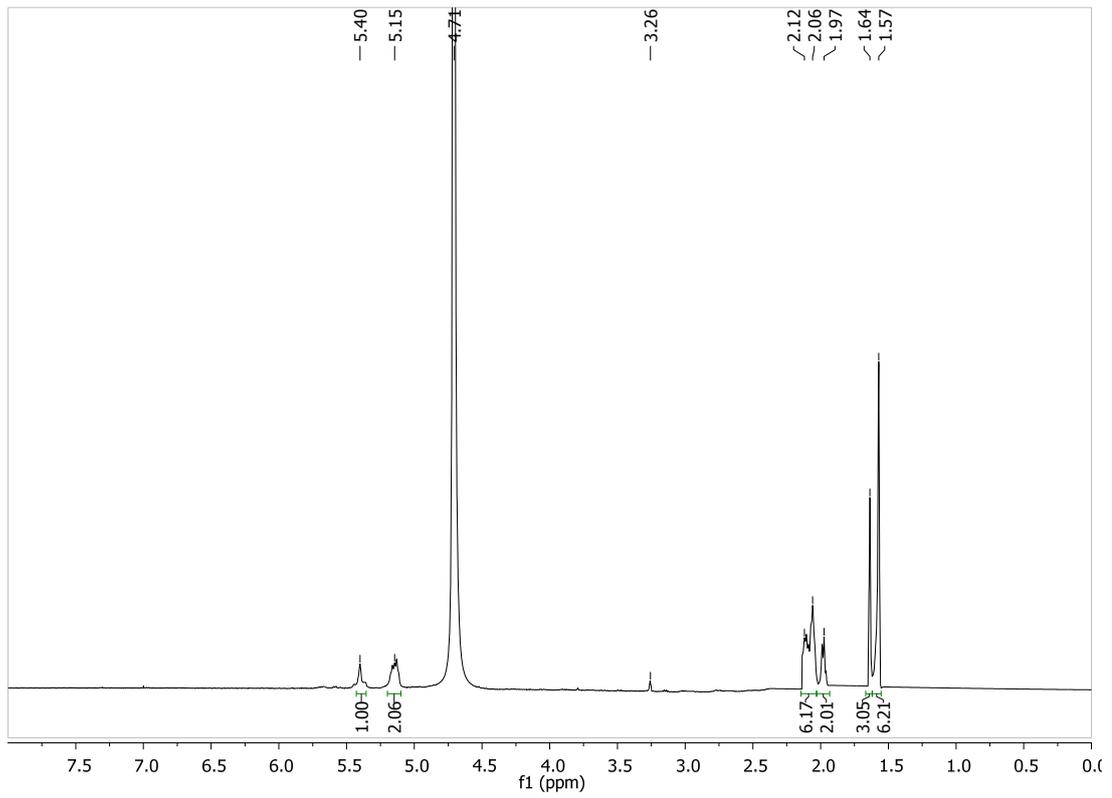
8.4.1.1 *(2E,6E)*-3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecantriensäure (*(2E,6E)*-77)



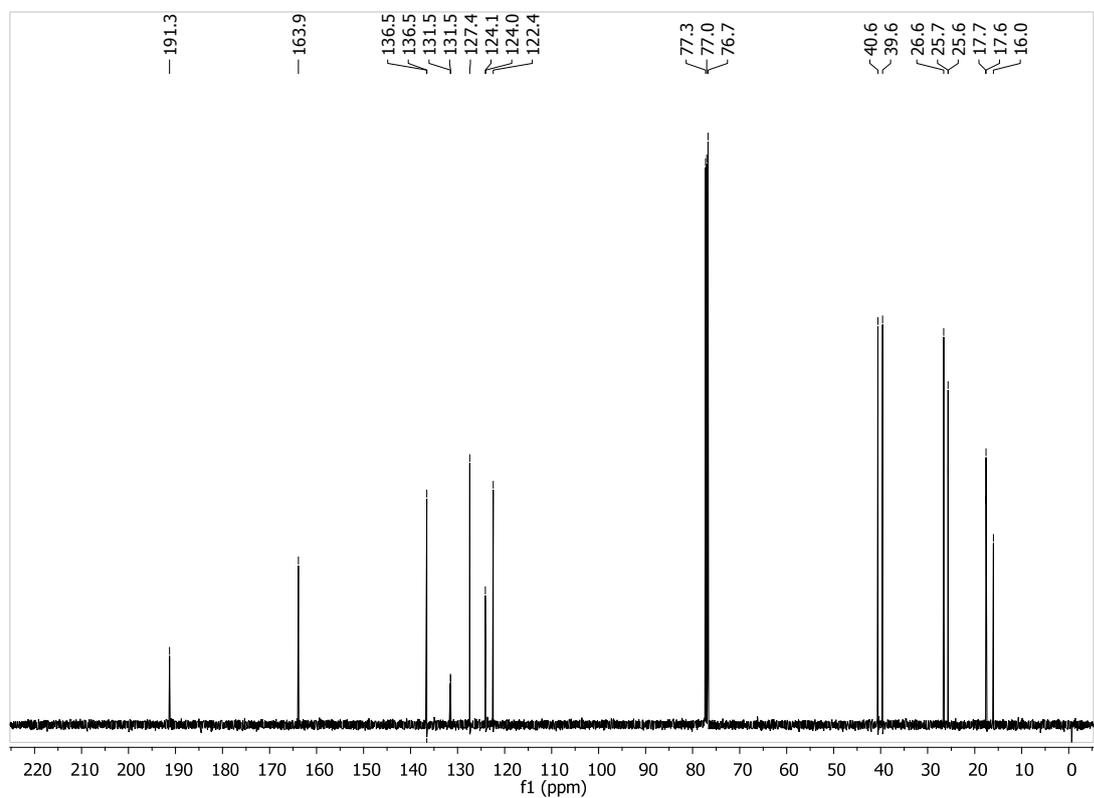
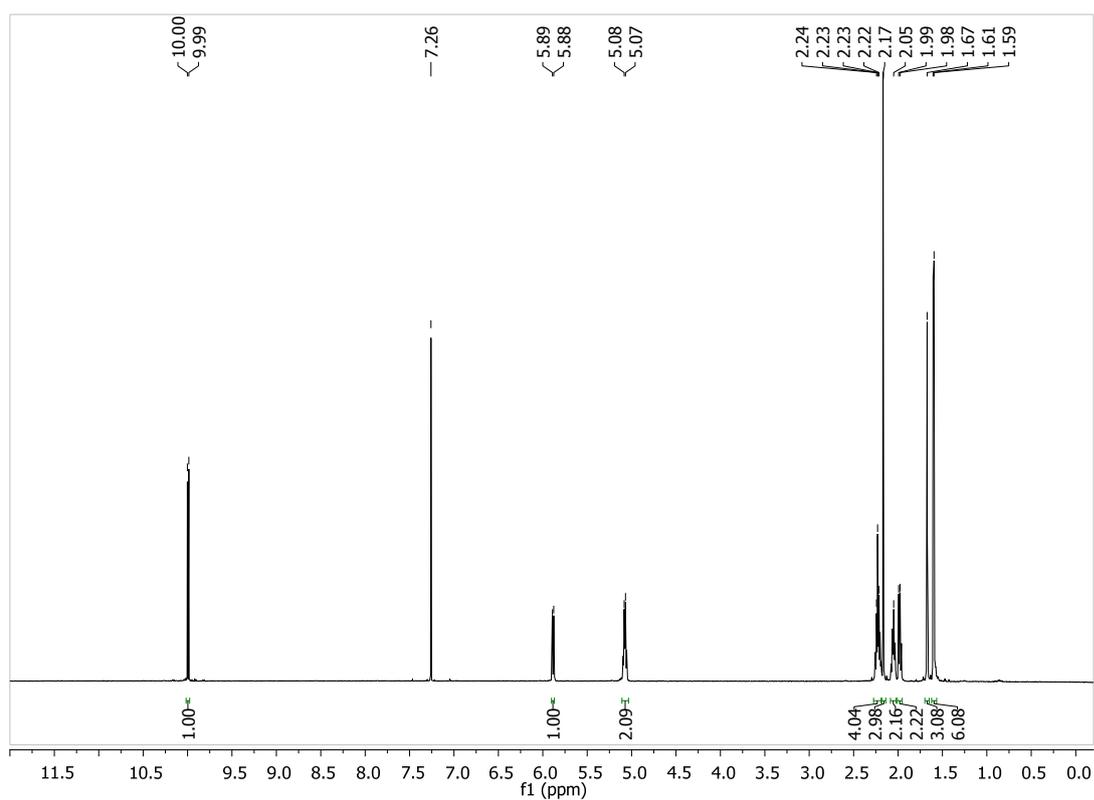
8.4.1.2 (2Z,6E)-3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecantriensäure ((2Z,6E)-77)

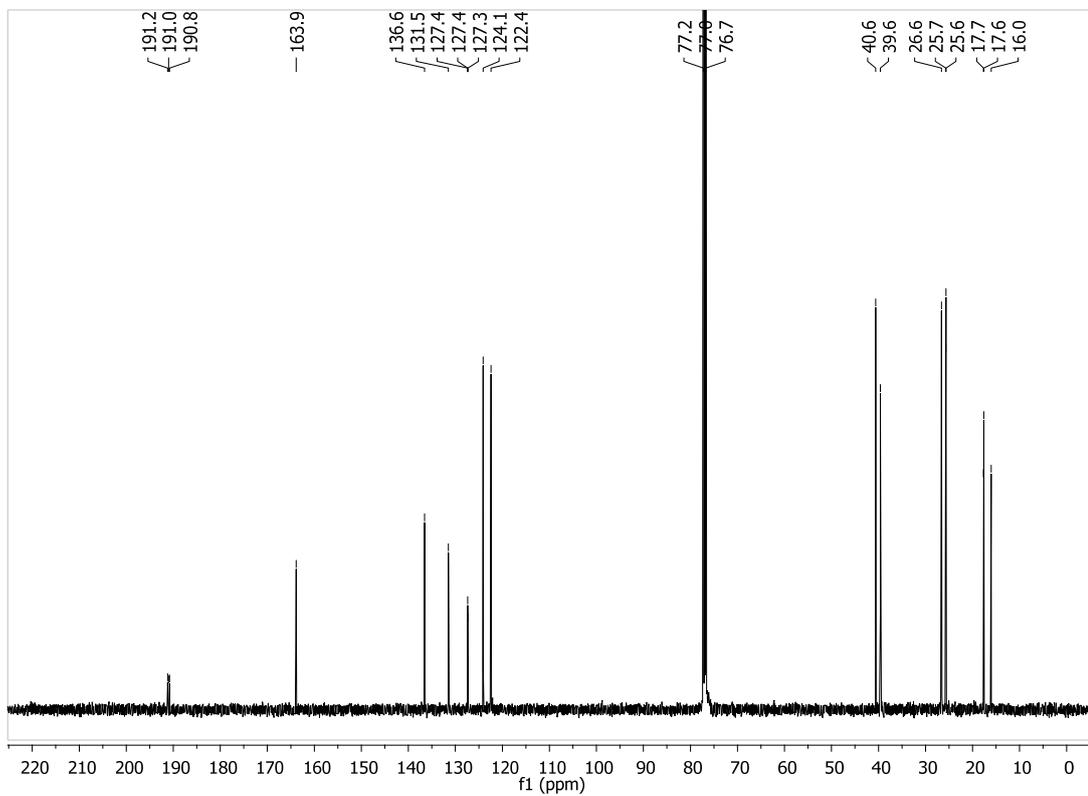
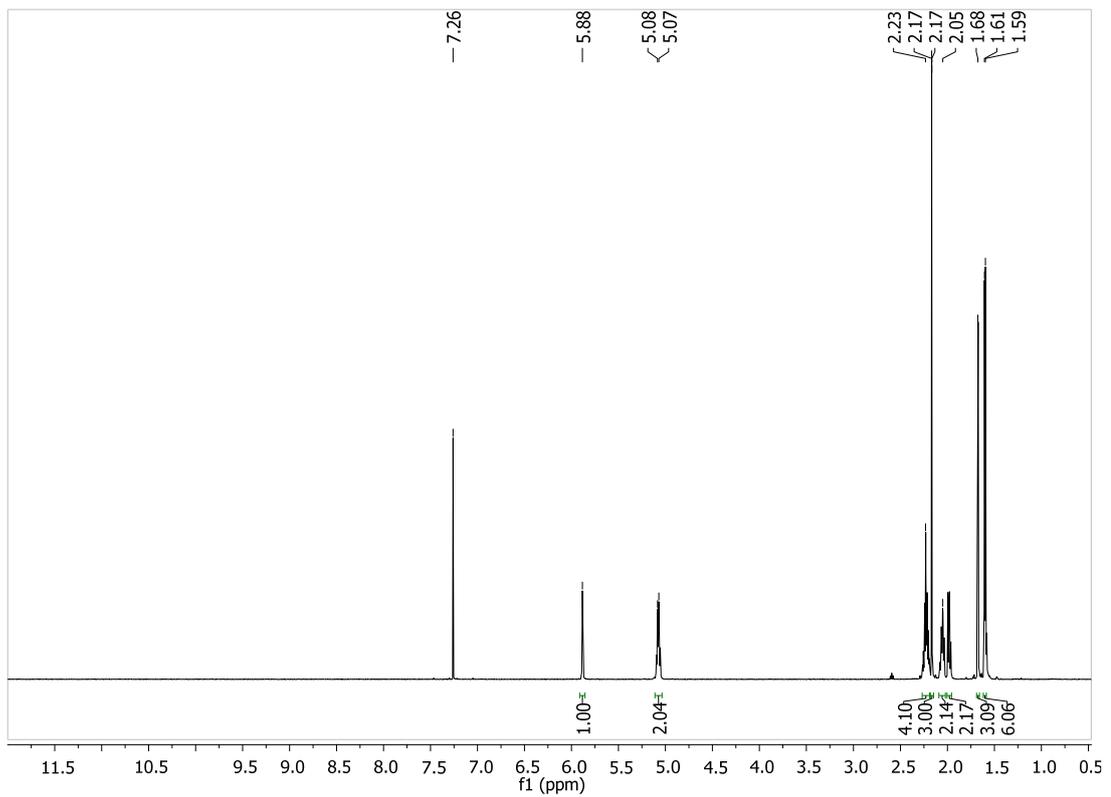


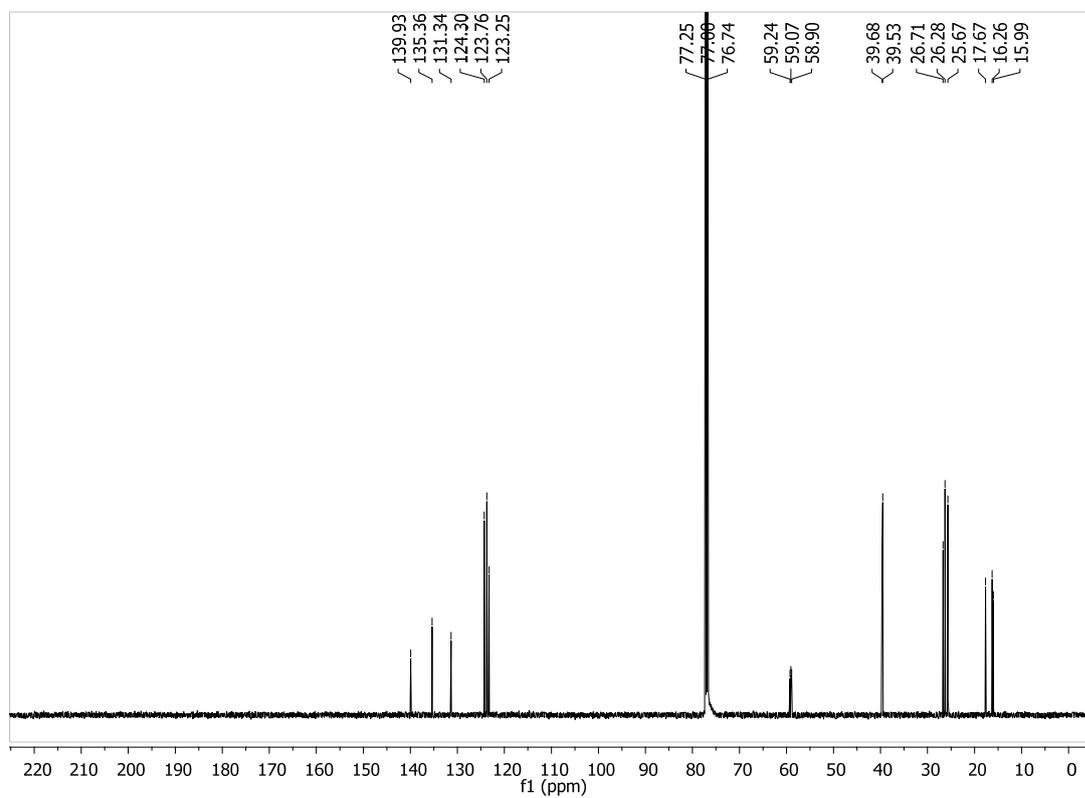
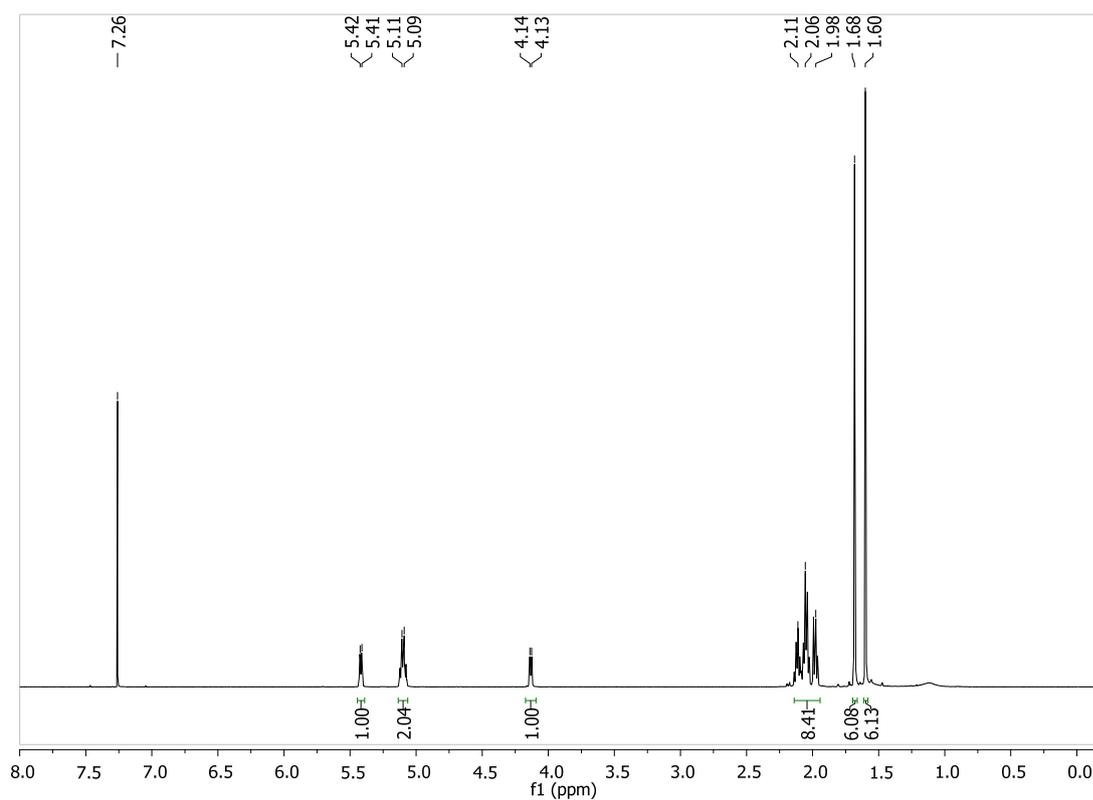
8.4.1.3 $[1,1\text{-}^2\text{H}_2]\text{-(2E,6E)\text{-Farnesol}} ([1,1\text{-}^2\text{H}_2]\text{-78})$ 

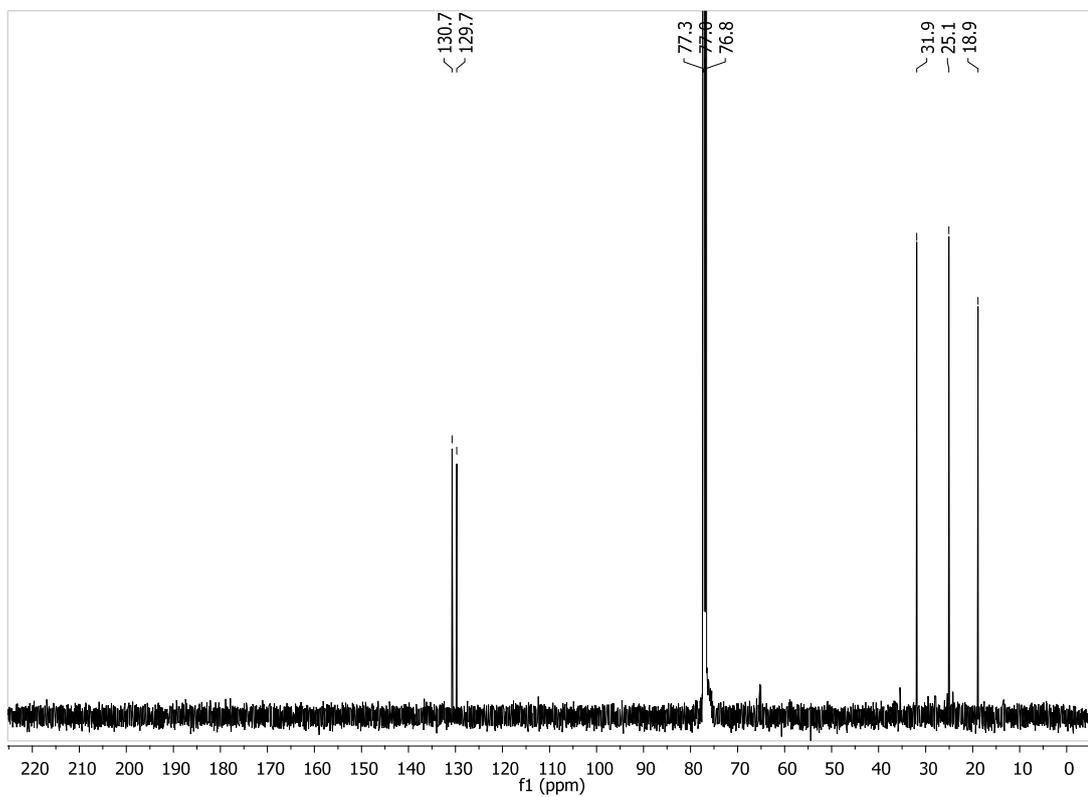
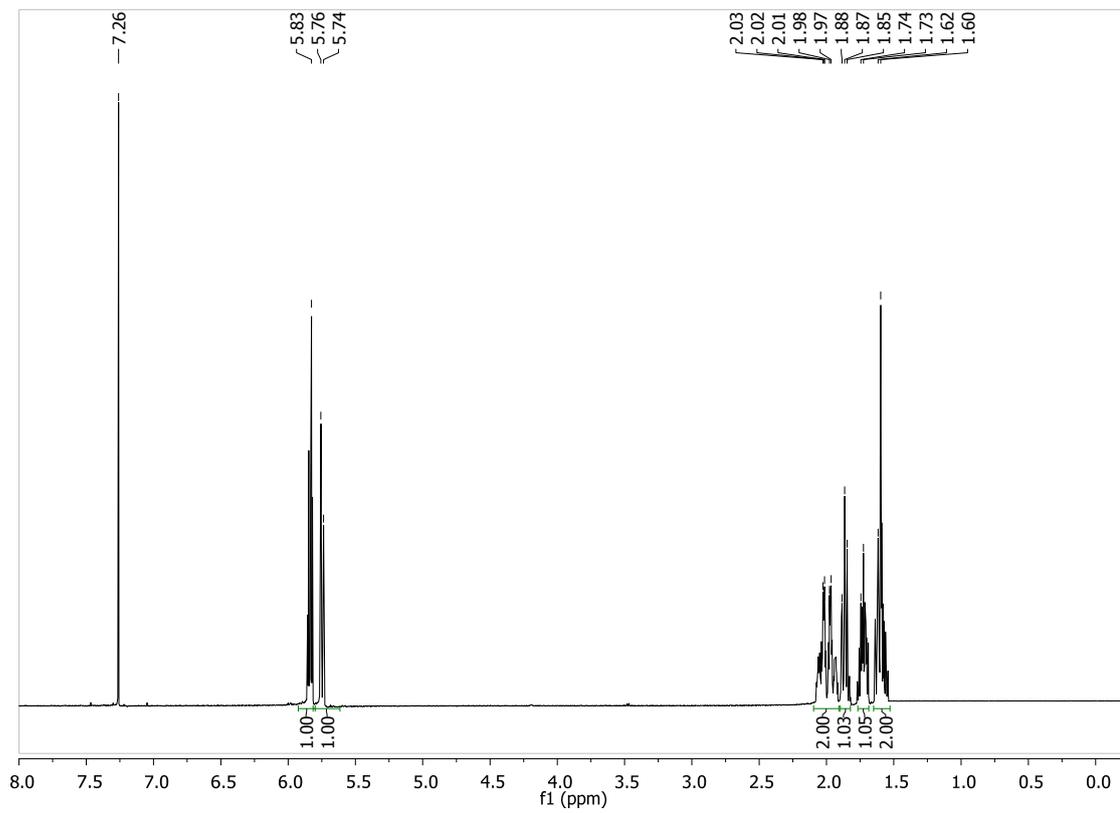
8.4.1.4 $[1,1\text{-}^2\text{H}_2]\text{-(2E,6E)\text{-Farnesyldiphosphat ([1,1-}^2\text{H}_2\text{]-22)}$ 

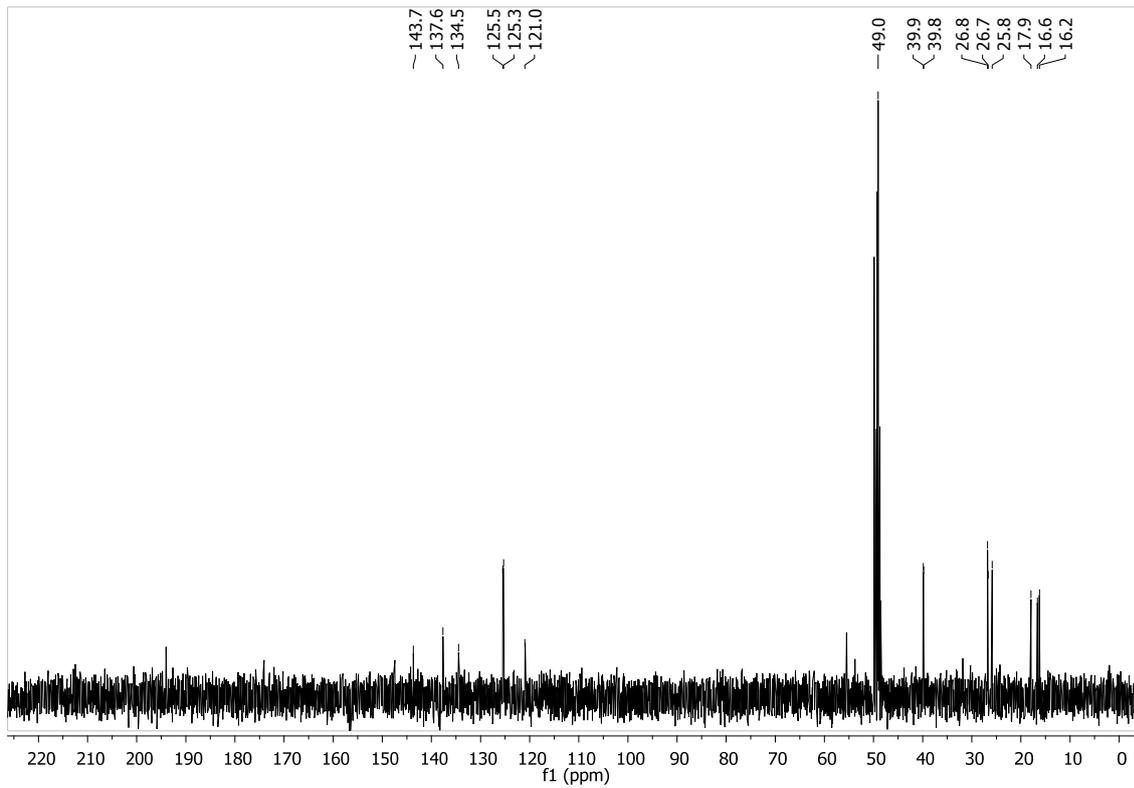
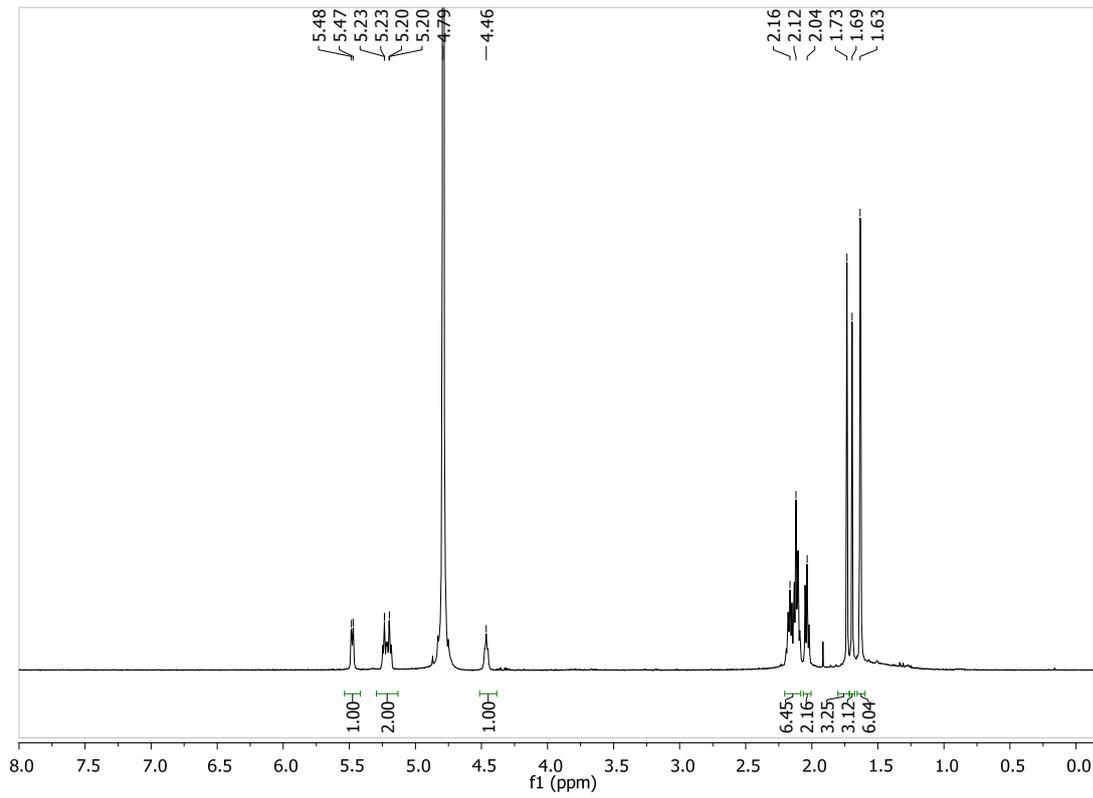
8.4.1.5 (2E,6E)-Farnesal (80)



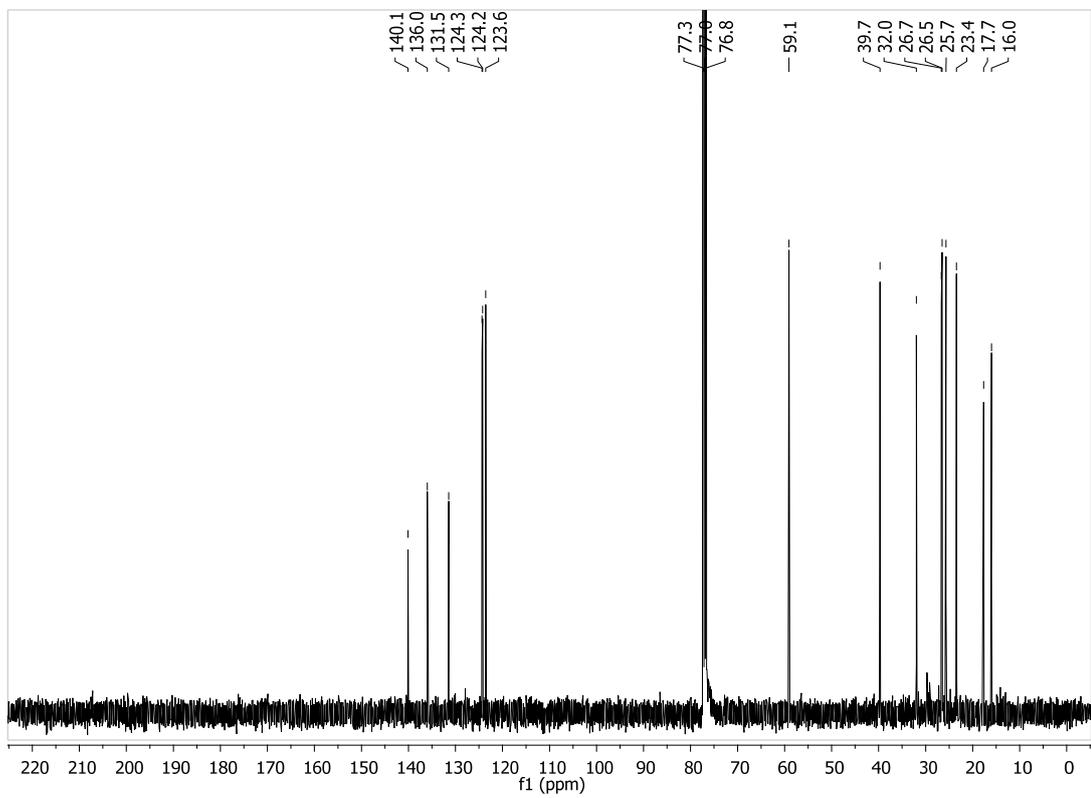
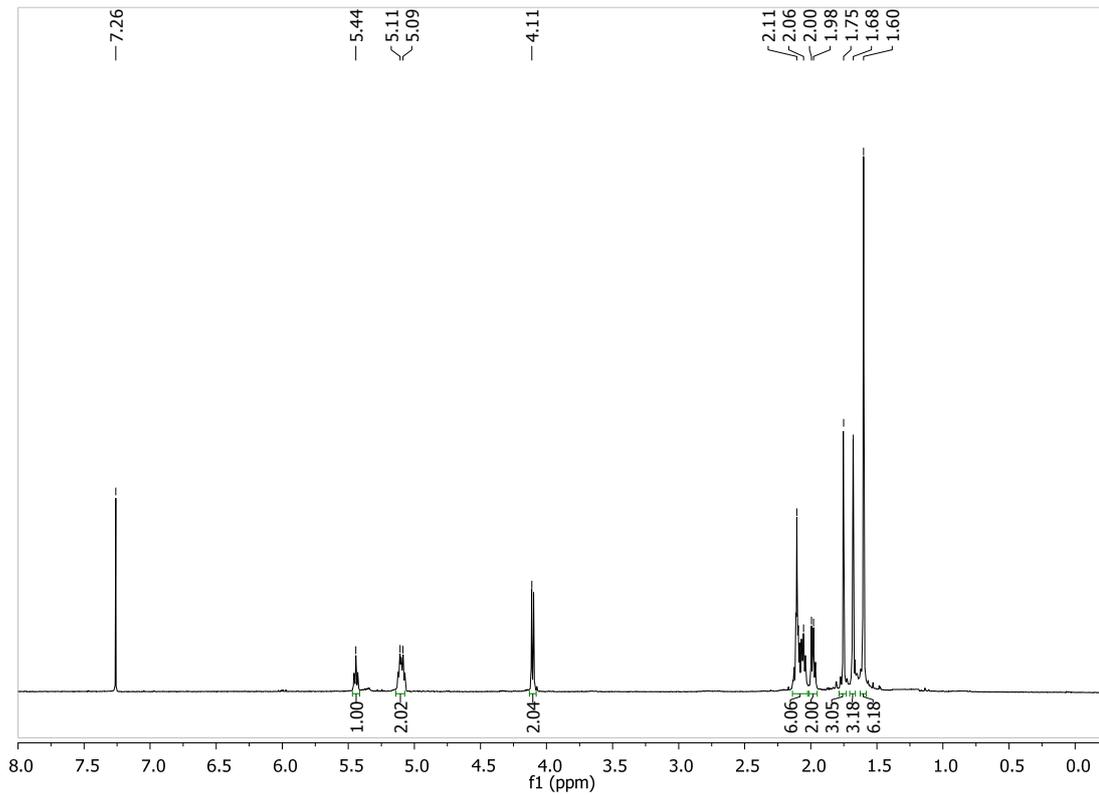
8.4.1.6 $[1-^2\text{H}]$ -(2E,6E)-Farnesal ($[1-^2\text{H}]$ -80)

8.4.1.7 (1R)-[1-²H]-(2E,6E)-Farnesol ((1R)-78)

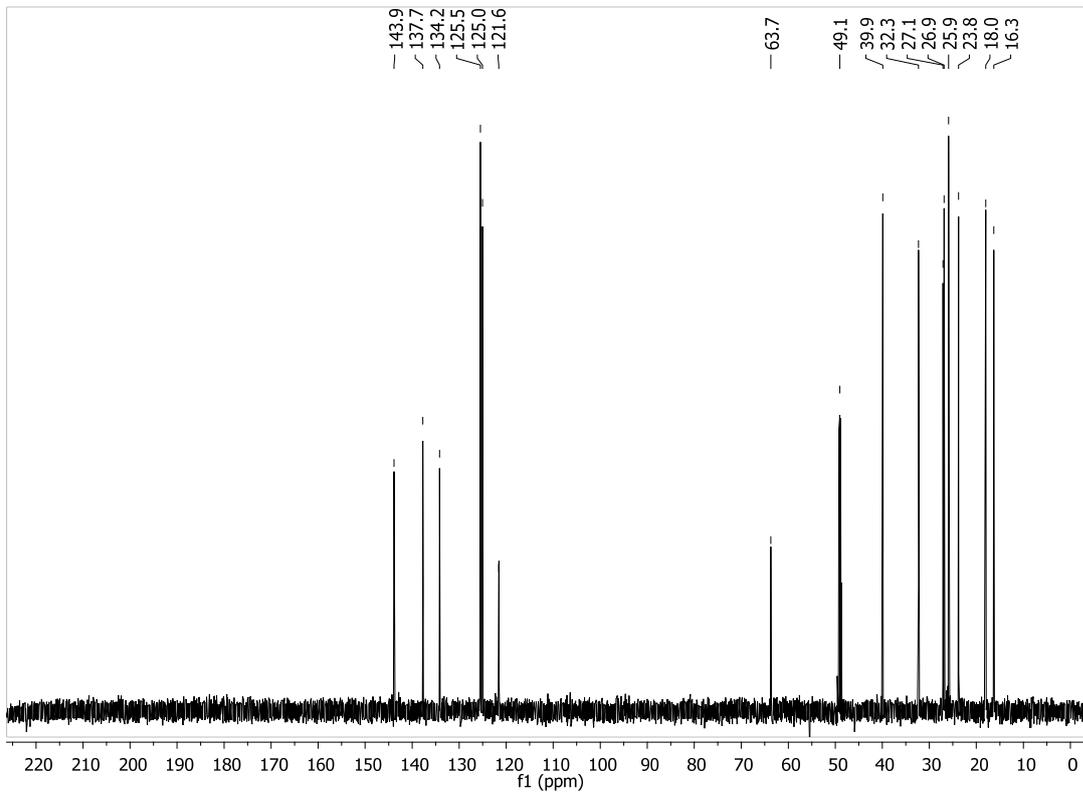
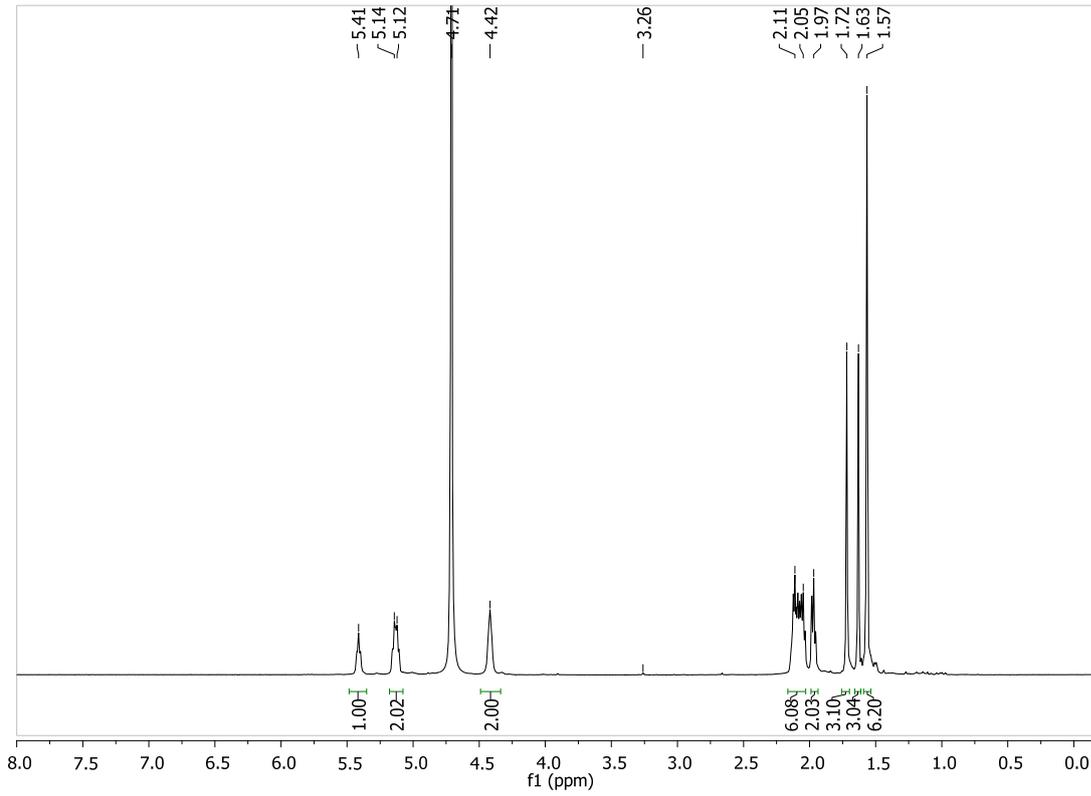
8.4.1.8 $[1-^2\text{H}]$ -Cyclohex-2-en-1-ol (81)

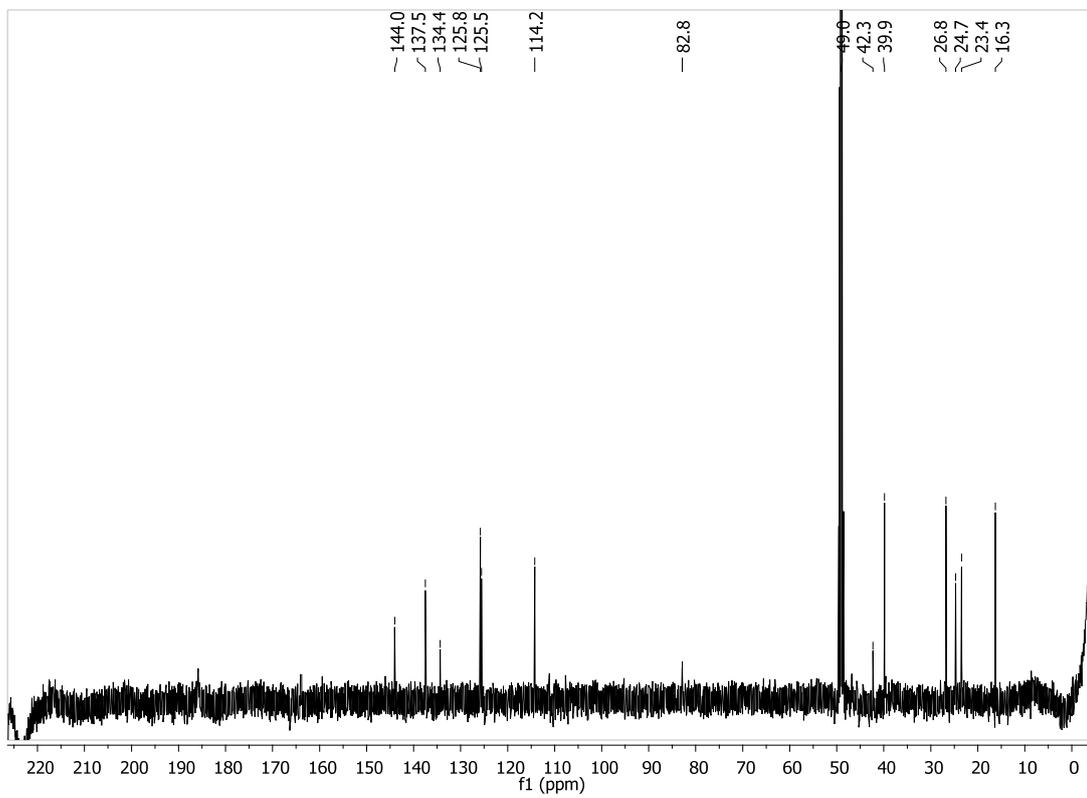
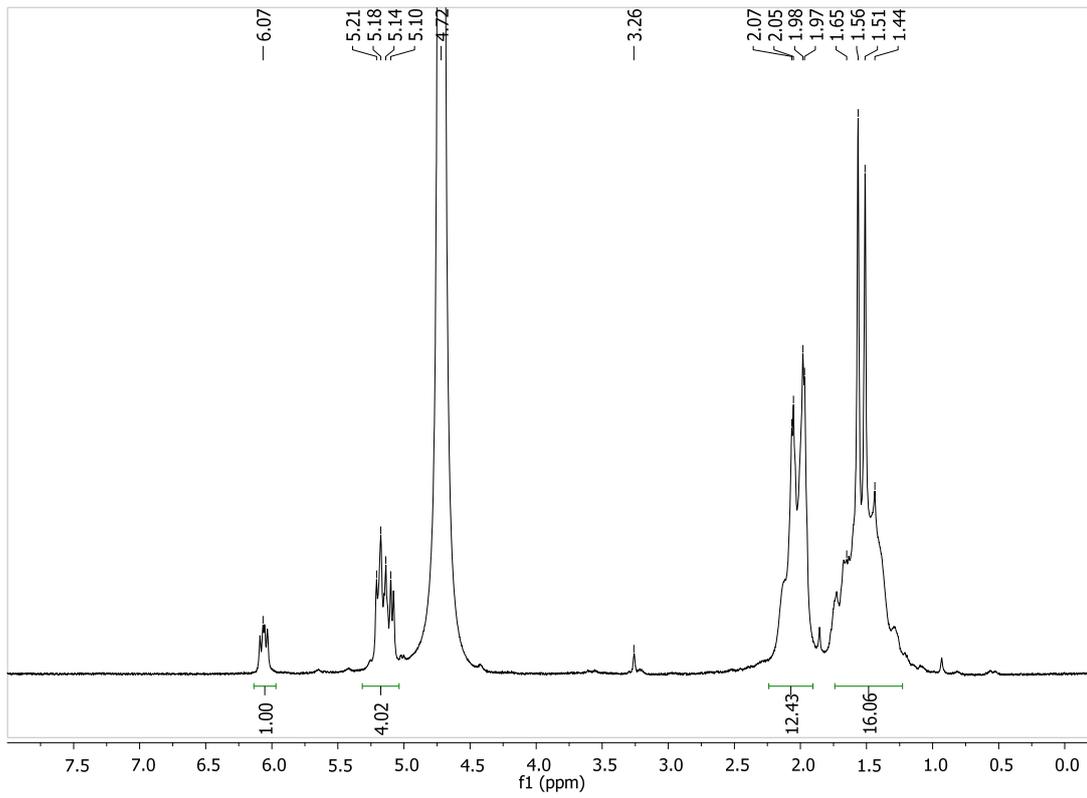
8.4.1.9 (1R)-[1-²H]-(2E,6E)-Farnesylidiphosphat ((1R)-22)

8.4.1.10 (2Z,6E)-Farnesol (79)

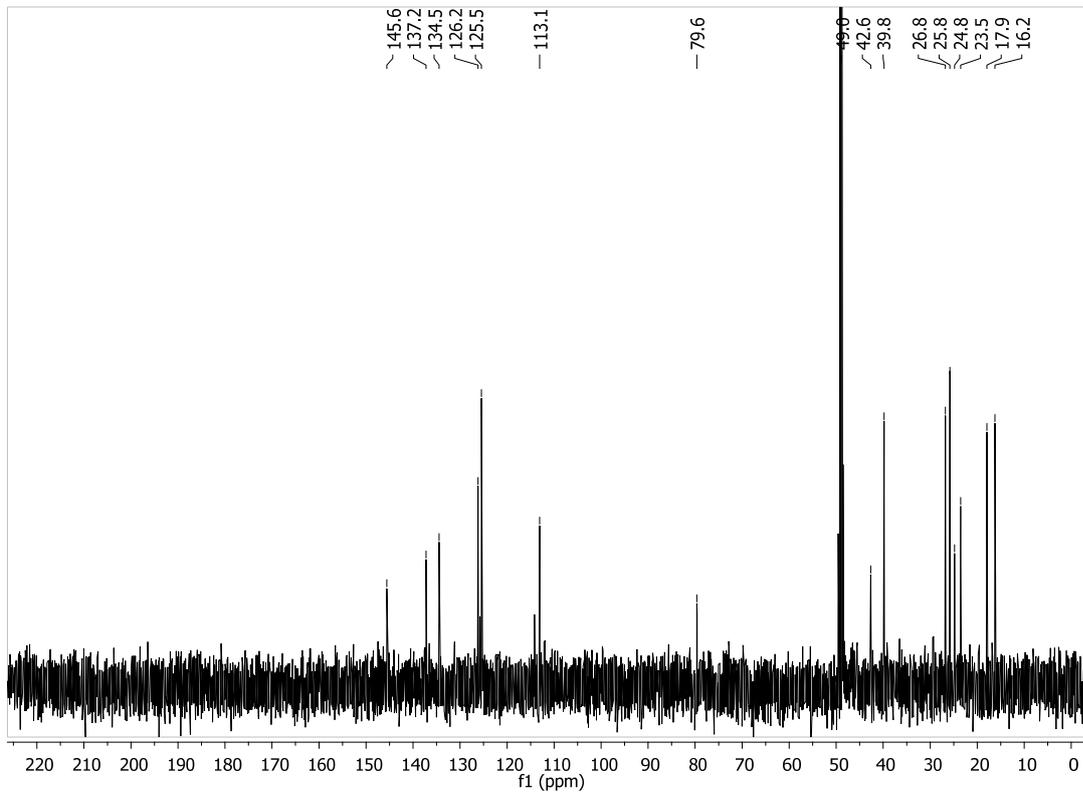
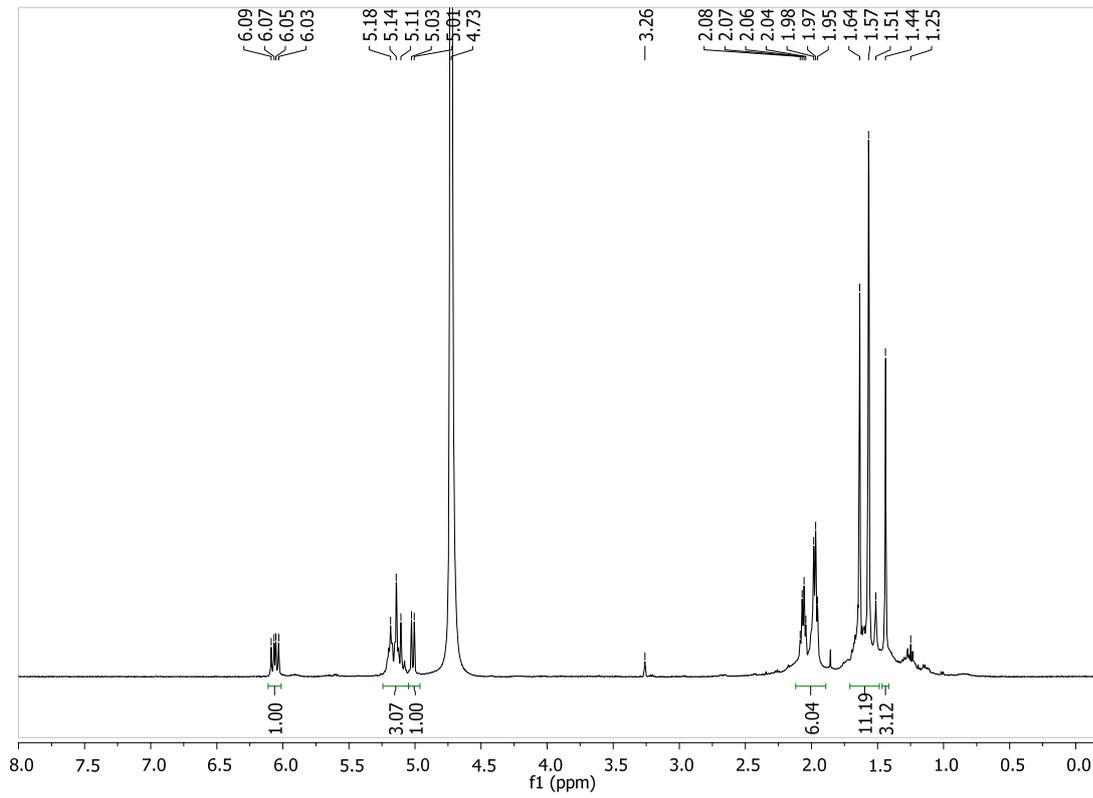


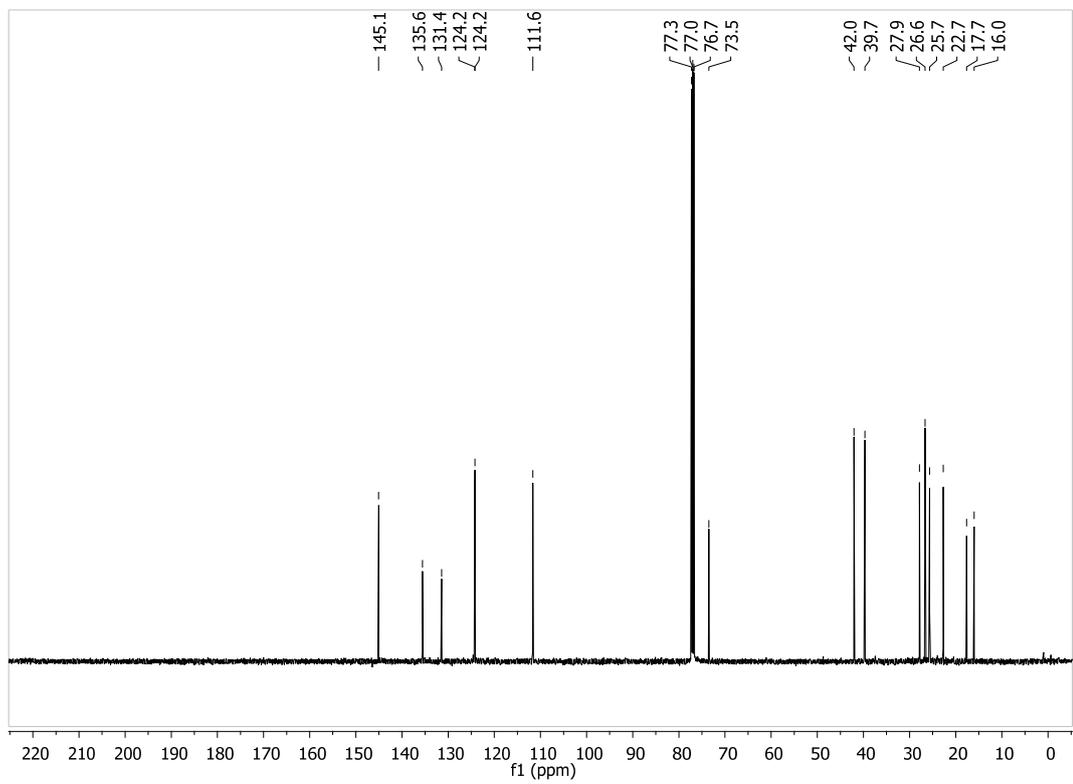
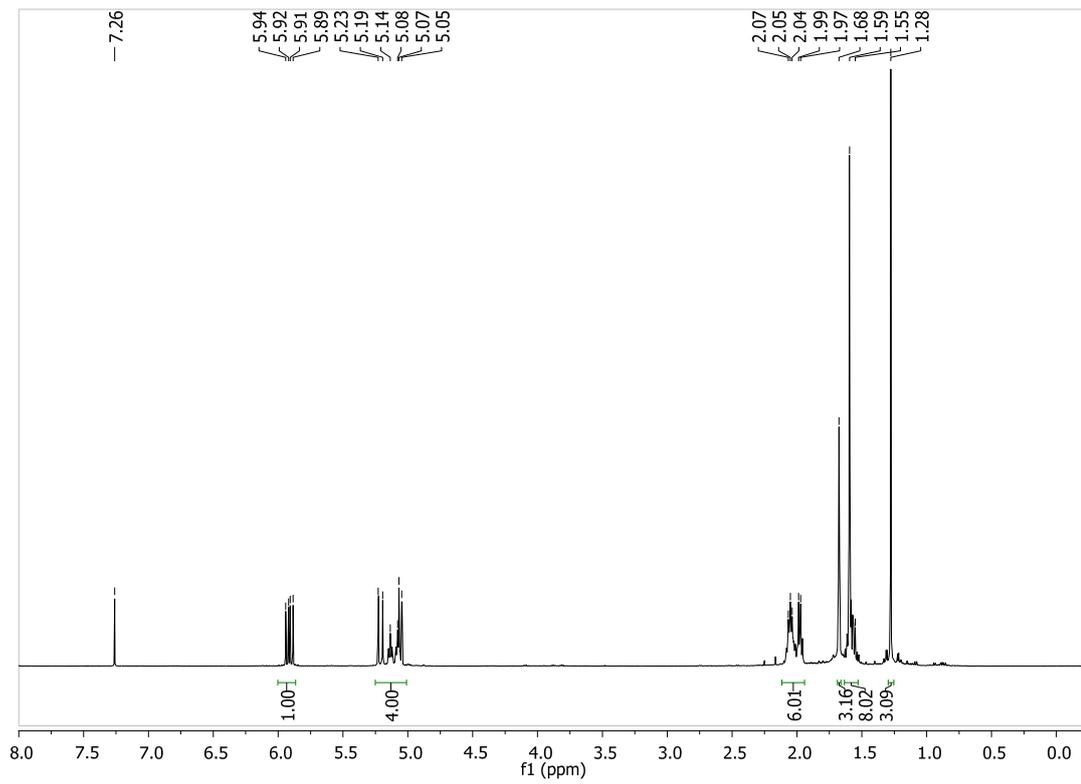
8.4.1.11 (2Z,6E)-Farnesyldiphosphat (76)



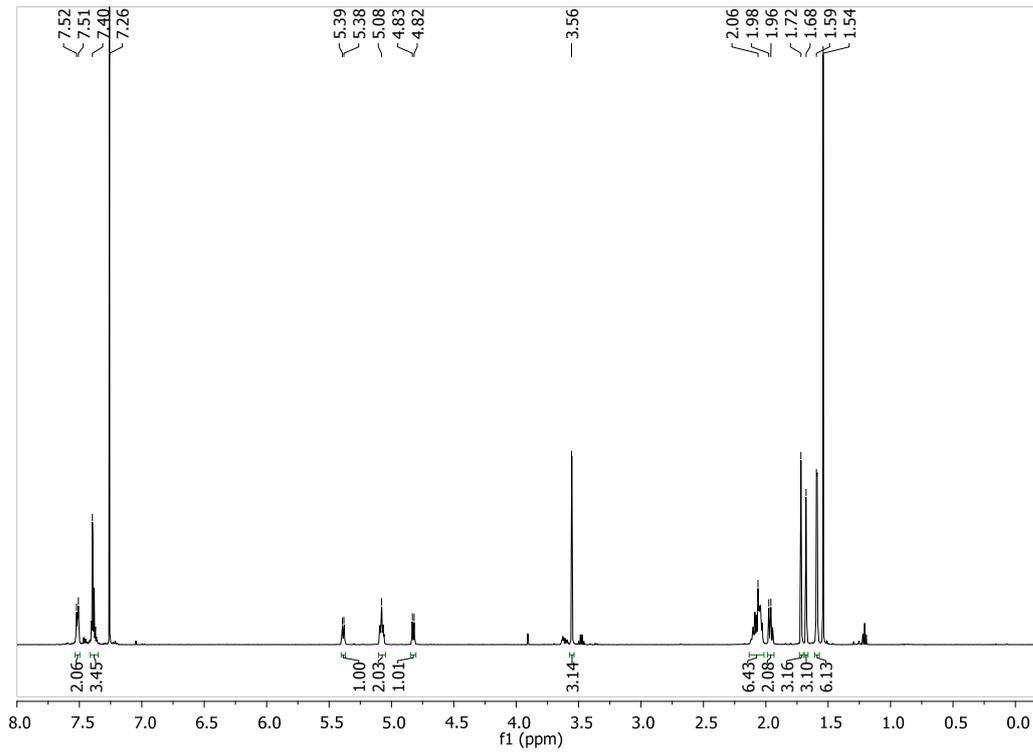
8.4.1.12 (3R)-[11,11,11,12,12,12-²H₆]-Nerolidyldiphosphat ((3R)-d₆-25)

8.4.1.13 (3S)-Nerolidyldiphosphat ((3S)-25)

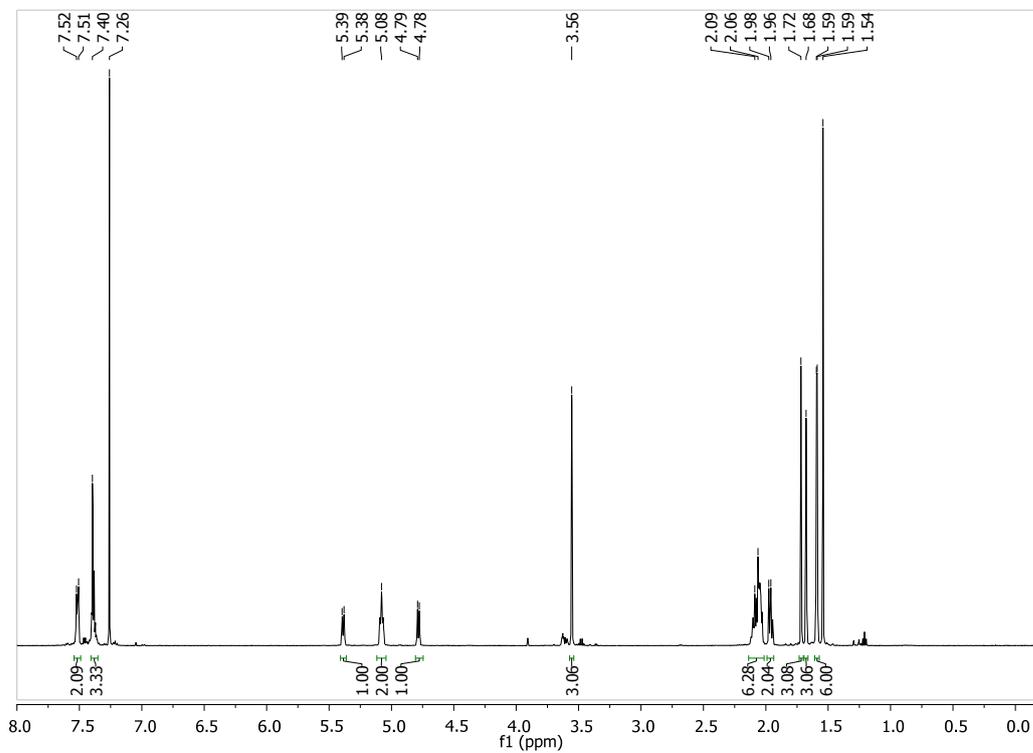


8.4.1.14 (3*RS*)-Nerolidol ((3*RS*)-48)

8.4.1.15 Mosher-Ester von (1R)-[1-²H]-(2E,6E)-Farnesol ((1R)-78)

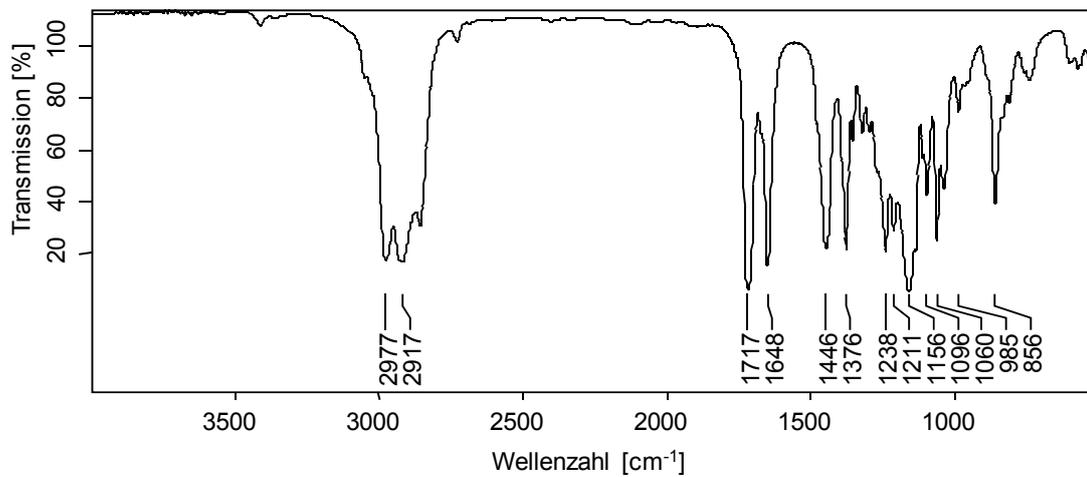


8.4.1.16 Mosher-Ester von (1S)-[1-²H]-(2E,6E)-Farnesol ((1S)-78)

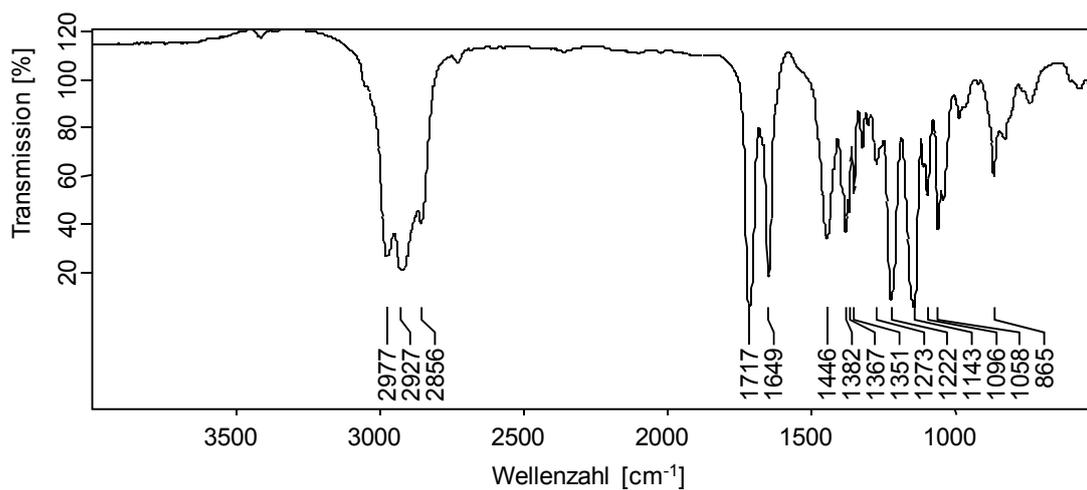


8.4.2 IR-Spektren

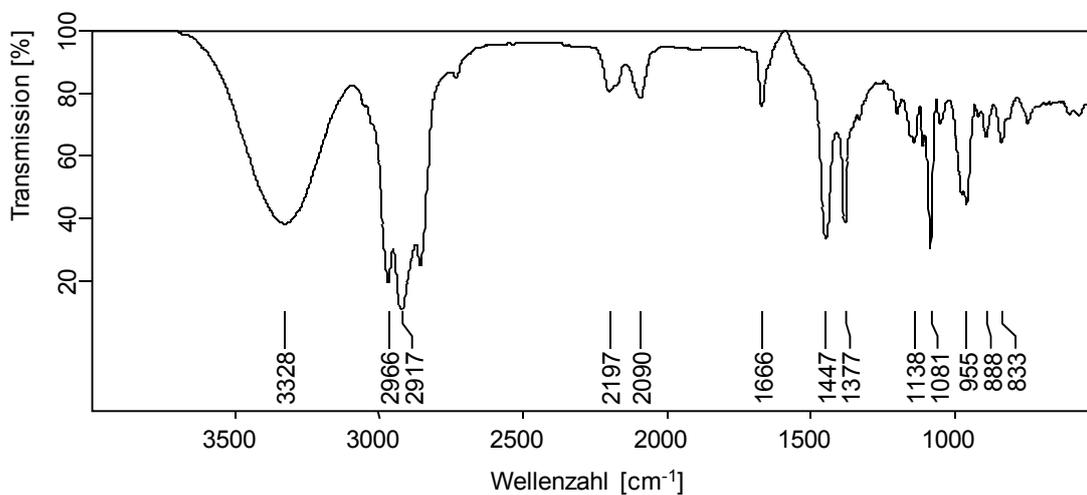
8.4.2.1 (2E,6E)-3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecantriensäure ((2E,6E)-77)



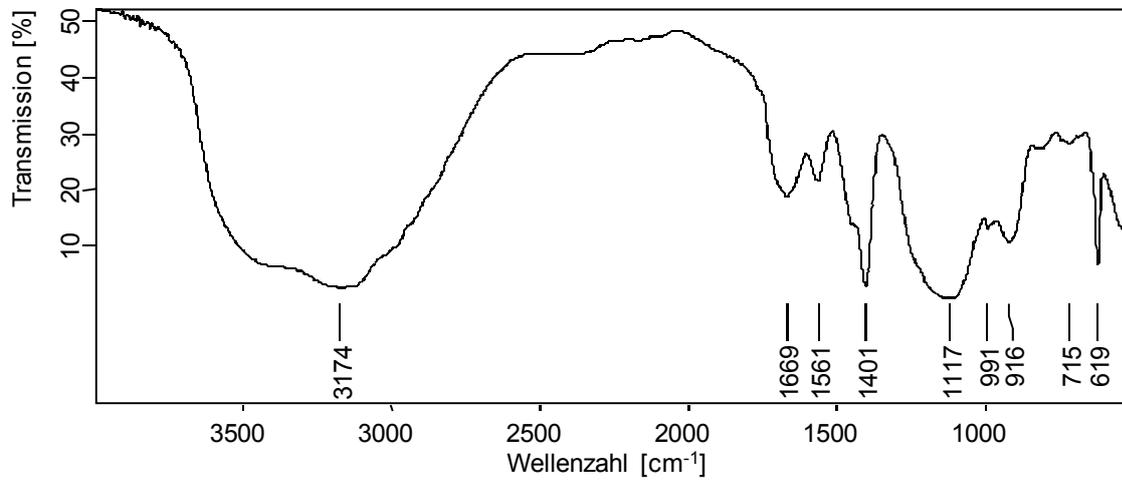
8.4.2.2 (2Z,6E)-3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecantriensäure ((2Z,6E)-77)



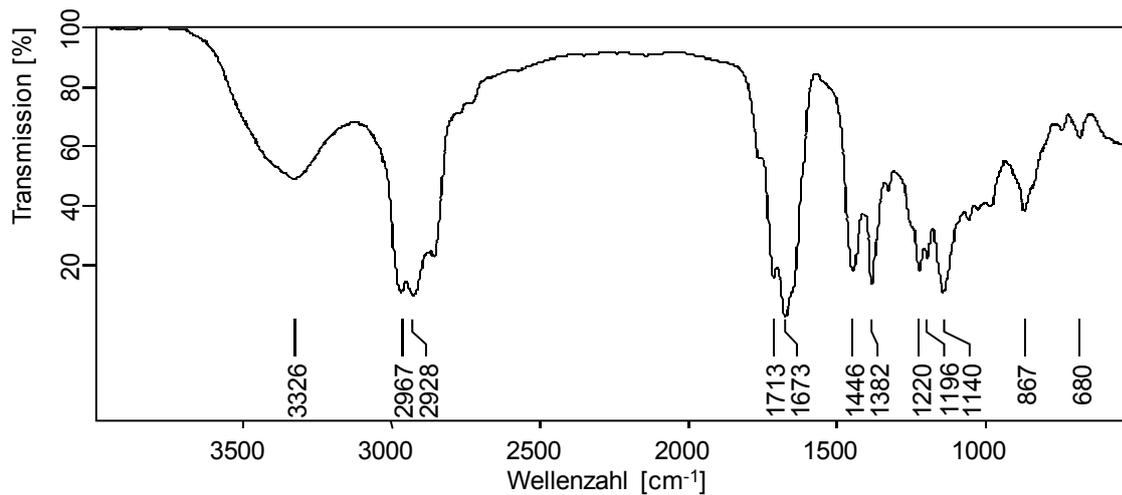
8.4.2.3 [1,1-²H₂]- (2E,6E)-Farnesol ([1,1-²H₂]-78)



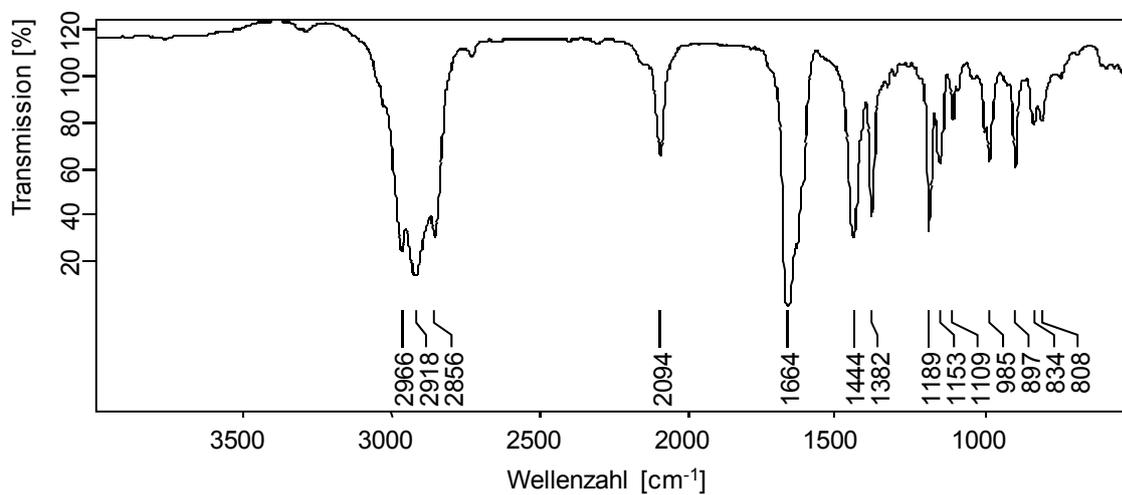
8.4.2.4 $[1,1\text{-}^2\text{H}_2]\text{-(2E,6E)\text{-Farnesyldiphosphat ([1,1-}^2\text{H}_2\text{]-22)}$

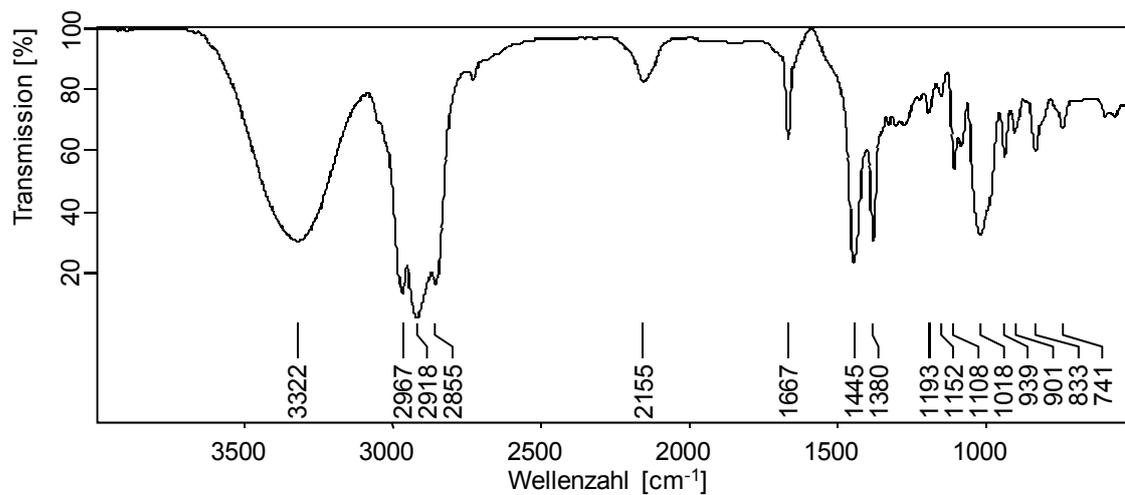
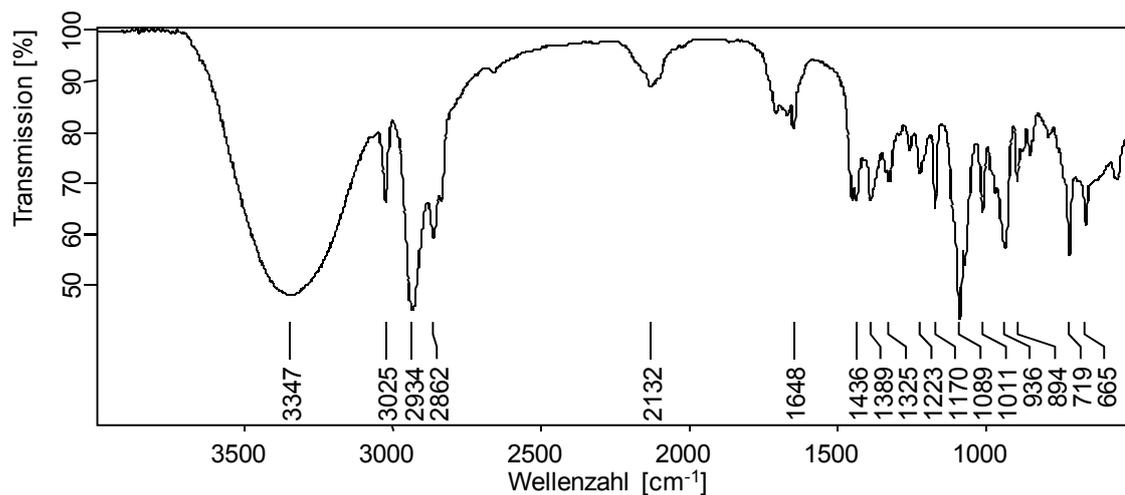
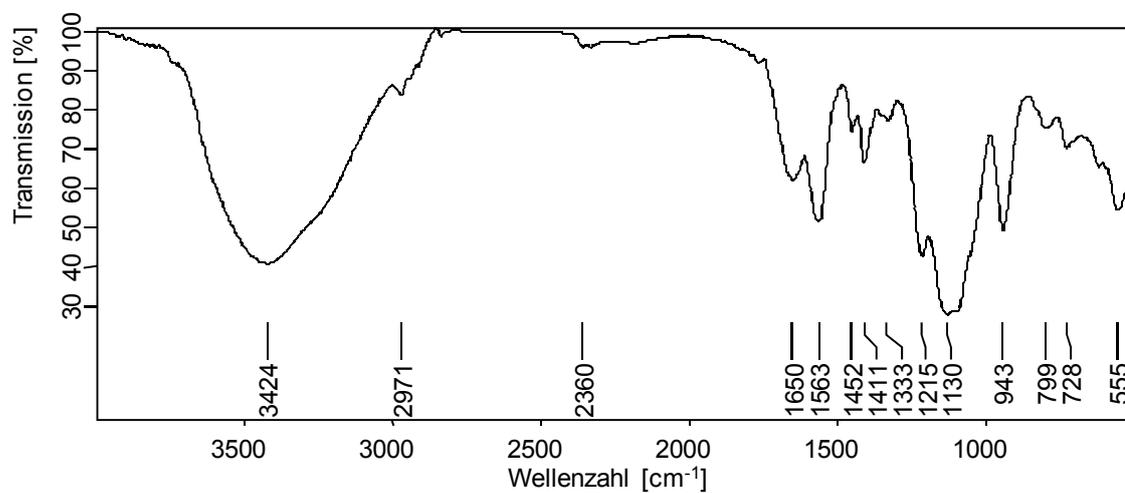


8.4.2.5 $(2E,6E)\text{-Farnesal (80)}$

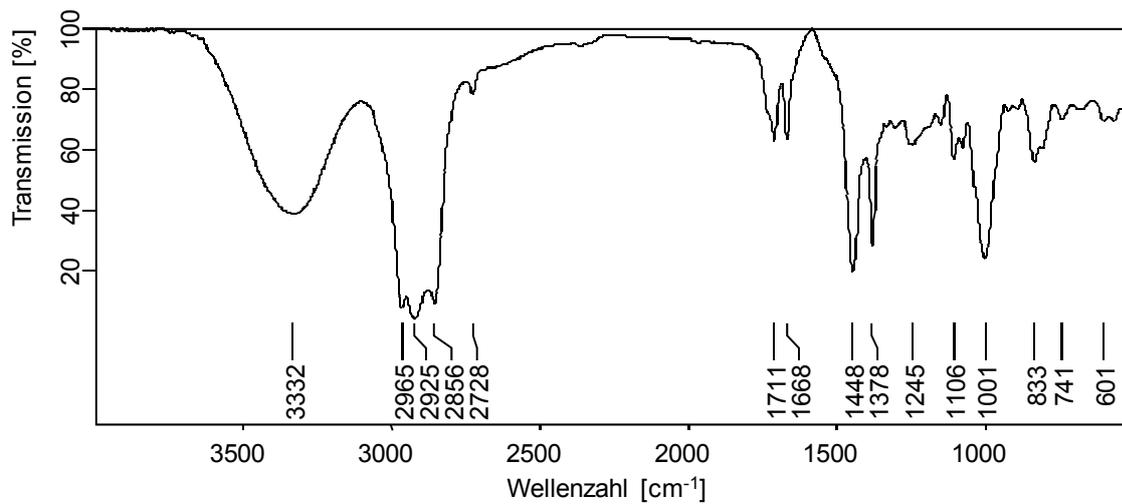


8.4.2.6 $[1\text{-}^2\text{H}]\text{-(2E,6E)\text{-Farnesal ([1-}^2\text{H]-80)}$

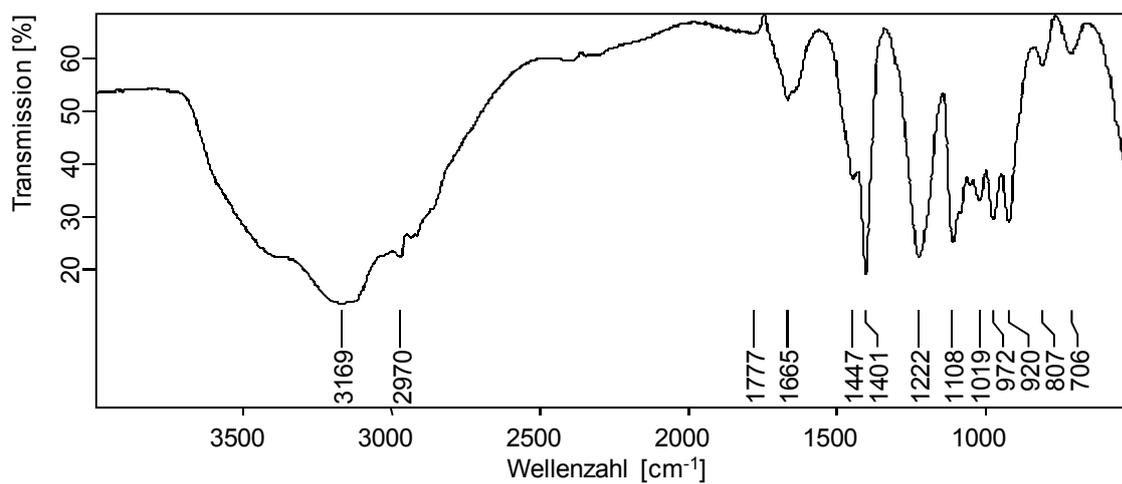
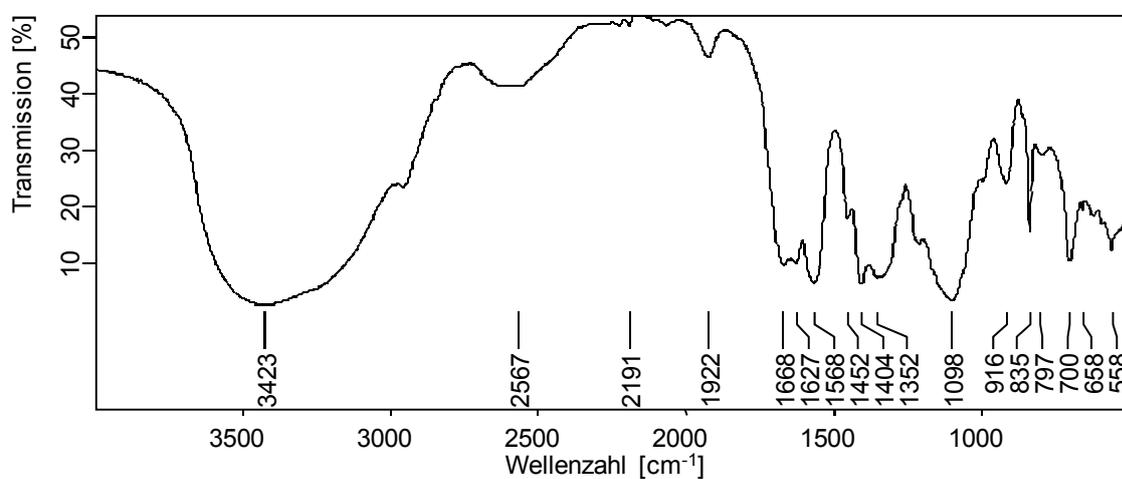


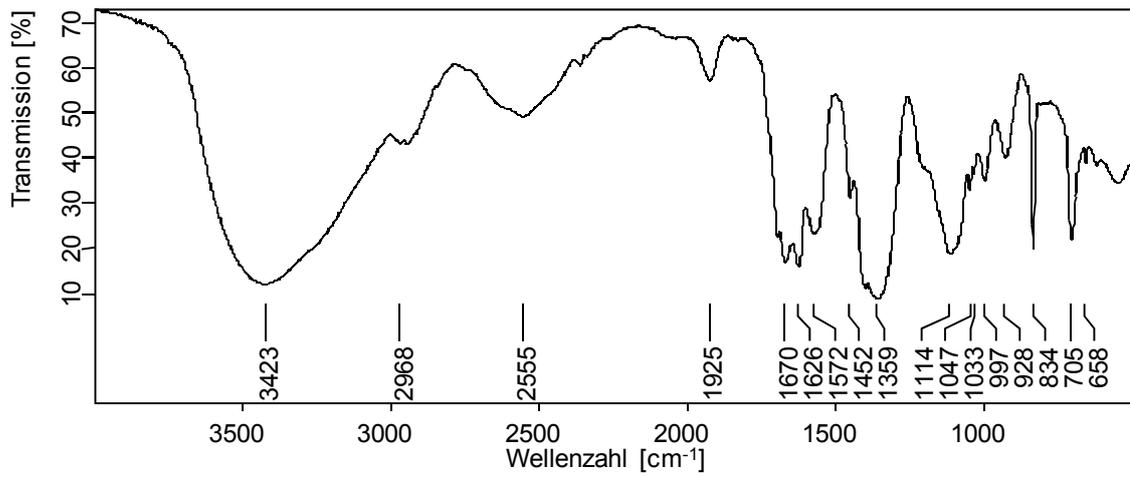
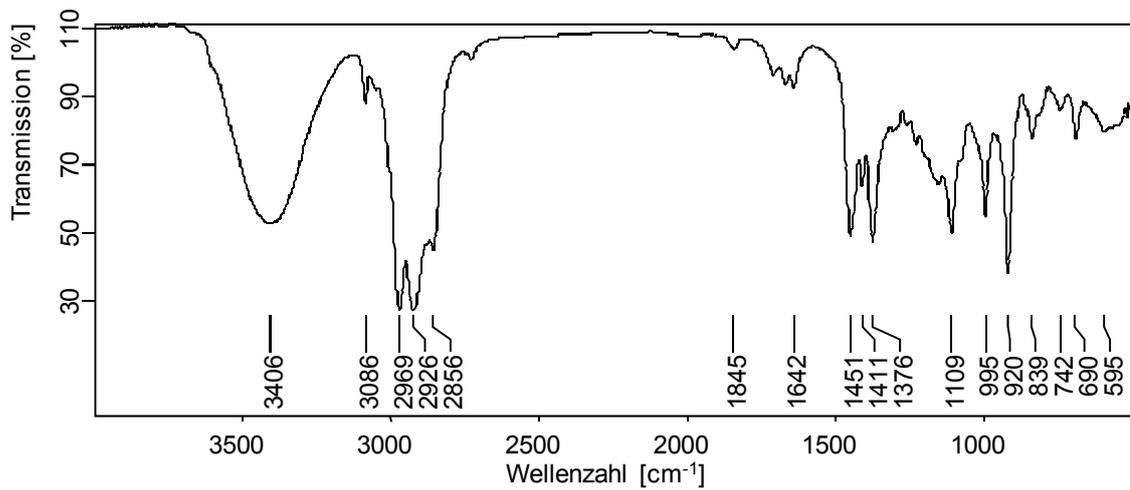
8.4.2.7 (1R)-[1-²H]-(2E,6E)-Farnesol ((1R)-78)**8.4.2.8 [1-²H]-Cyclohex-2-en-1-ol (81)****8.4.2.9 (1R)-[1-²H₂]- (2E,6E)-Farnesylidiphosphat ((1R)-22)**

8.4.2.10 (2Z,6E)-Farnesol (79)



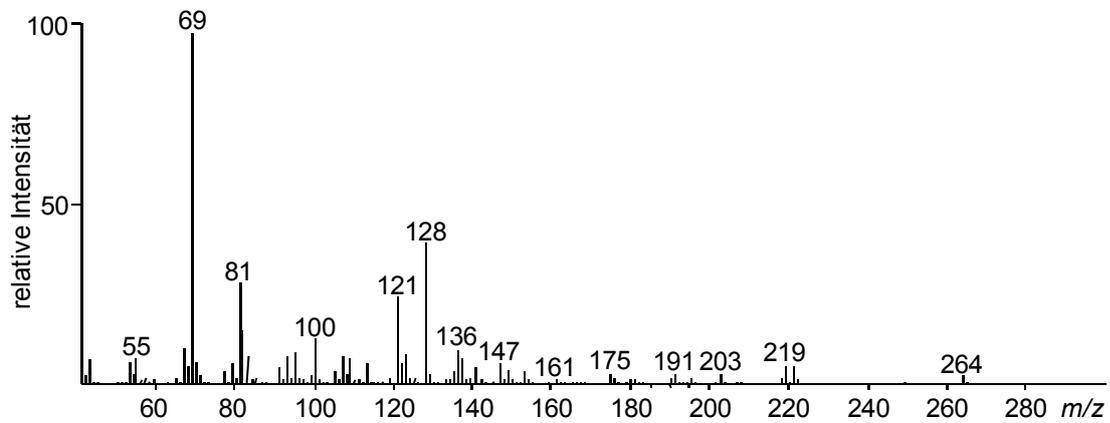
8.4.2.11 (2Z,6E)-Farnesylidiphosphat (76)

8.4.2.12 (3R)-[12,12,12,13,13,13-²H₆]-Nerolidylidiphosphat ((3R)-d₆-25)

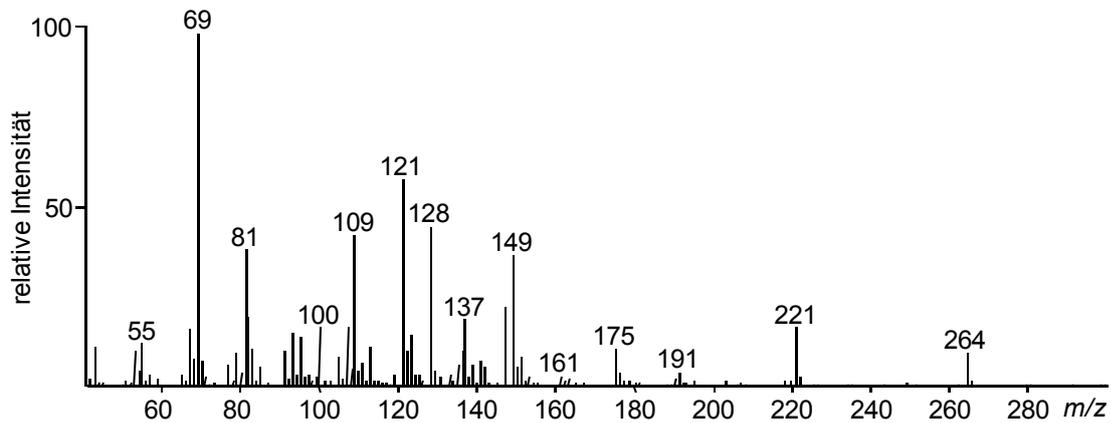
8.4.2.13 (3S)-Nerolidyldiphosphat ((3S)-25)**8.4.2.14 (3RS)-Nerolidol ((3RS)-48)**

8.4.3 MS-Spektren

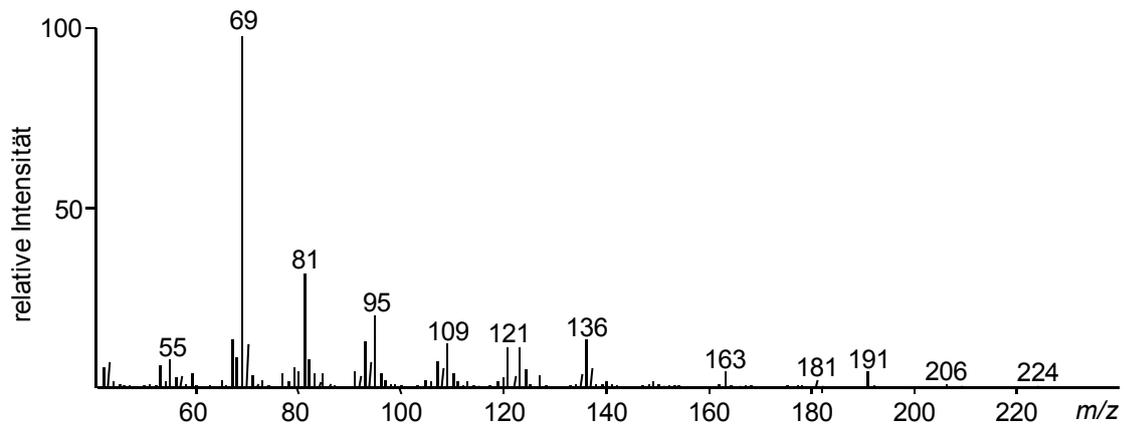
8.4.3.1 (2E,6E)-3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecantriensäure ((2E,6E)-77)

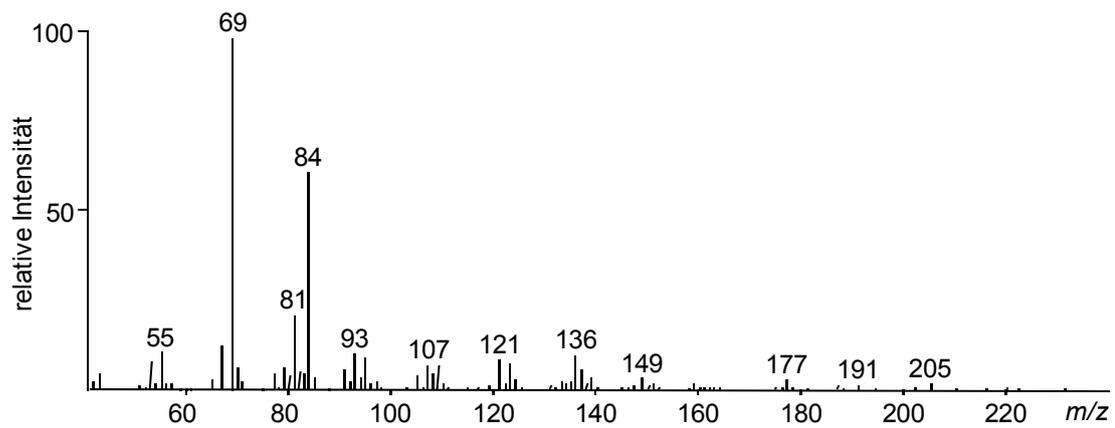
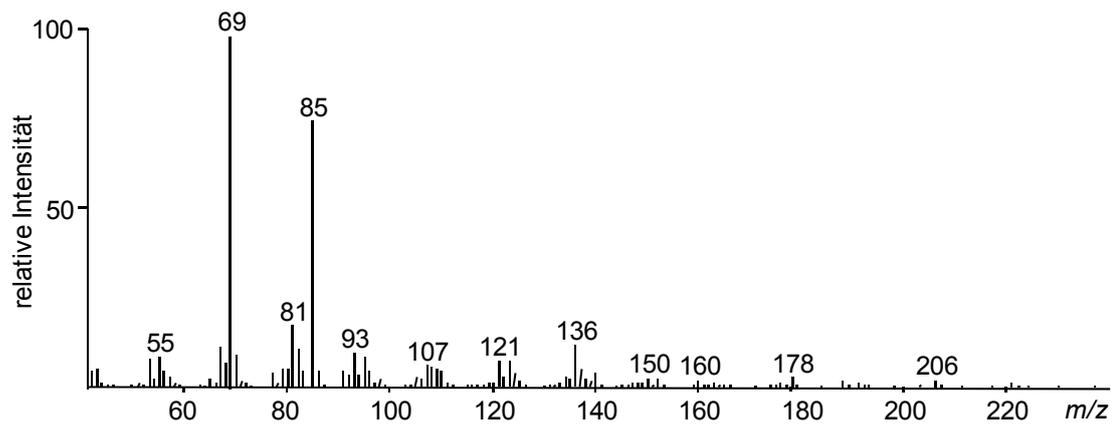
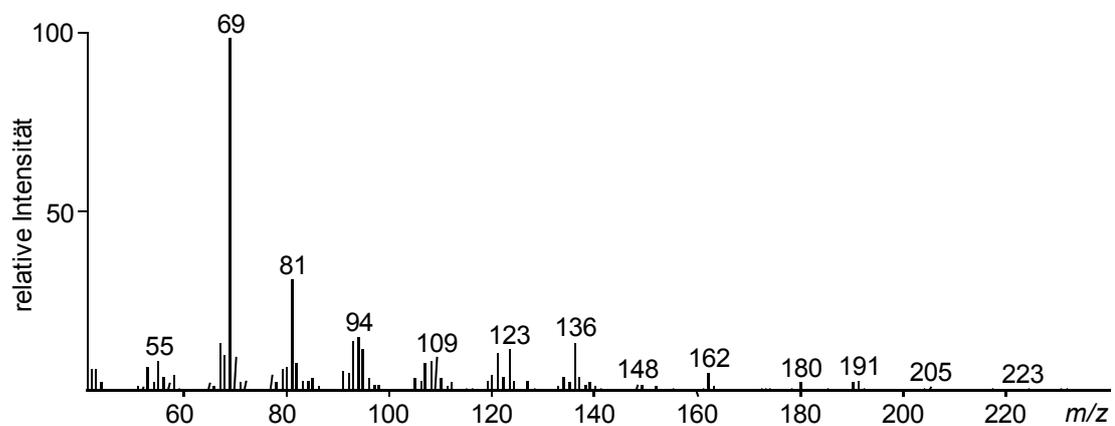


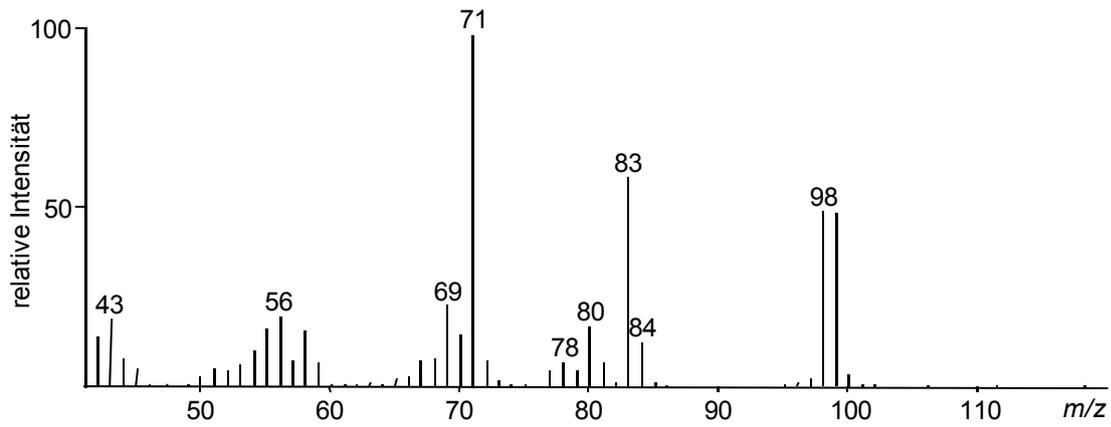
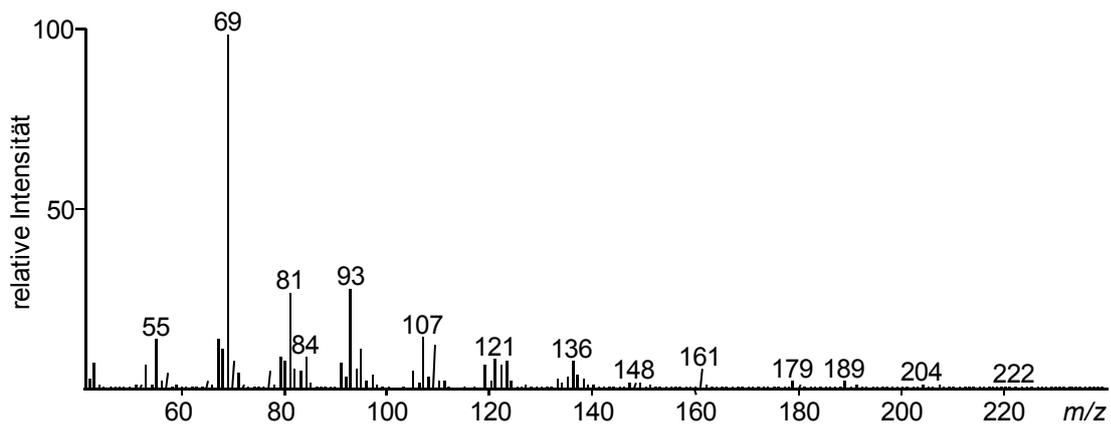
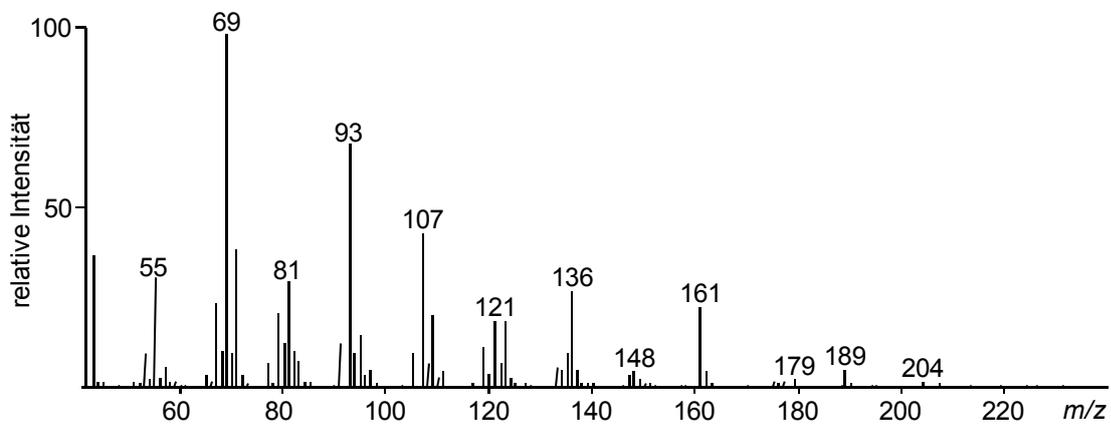
8.4.3.2 (2Z,6E)-3,7,11-Trimethyl-2,6,10-dodecantriensäure ((2Z,6E)-77)



8.4.3.3 [1,1-²H₂]- (2E,6E)-Farnesol ([1,1-²H₂]-78)



8.4.3.4 (2E,6E)-Farnesal (80)**8.4.3.5 [1-²H]-(2E,6E)-Farnesal ([1-²H]-80)****8.4.3.6 (1R)-[1-²H]-(2E,6E)-Farnesol ((1R)-78)**

8.4.3.7 [1-²H]-Cyclohex-2-en-1-ol (78)**8.4.3.8 (2Z,6E)-Farnesol (79)****8.4.3.9 (3RS)-Nerolidol ((3RS)-48)**

8.5 Veröffentlichungen

Wissenschaftliche Artikel

- Arimura, G. I.; Garms, S.; Maffei, M.; Bossi, S.; Schulze, B.; Leitner, M.; Mithöfer, A.; Boland, W.; Herbivore-induced terpenoid emission in *Medicago truncatula*: concerted action of jasmonate, ethylene and calcium signalling, *Planta* **2008**, *227*, 453.
- Garms, S.; Boland, W.; Arimura, G. I.; Early herbivore-elicited events in terpenoid biosynthesis, *Plant Signaling & Behaviour* **2008**, *3*, 418.
- Wilhelm, B.; Stefan, G.; Induced volatiles of *Medicago truncatula*: molecular diversity and mechanistic aspects of a multiproduct sesquiterpene synthase from *M. truncatula*, *Flavour and Fragrance Journal* **2010**, *25*, 114.
- Garms, S.; Köllner, T.; Boland, W.; A Multiproduct Terpene Synthase from *Medicago truncatula* Generates Cadalane Sesquiterpenes via Two Different Mechanisms, *The Journal of Organic Chemistry* **2010**, *75*, 5590.
- Paetzold, H.; Garms, S.; Bartram, S.; Wieczorek, J.; Uros-Gracia, E.-M.; Rodriguez-Concepcion, M.; Boland, W.; Strack, D.; Hause, B.; Walter, M. H.; The Isogene *l*-Deoxy-*D*-Xylulose 5-Phosphate Synthase 2 Controls Isoprenoid Profiles, Precursor Pathway Allocation, and Density of Tomato Trichomes, *Molecular Plant* **2010**, *3*, 904.
- Autorentätigkeit bei Georg Thieme Verlag Stuttgart; Überarbeitung von Stichwörtern im Fachgebiet „Terpene bis C15“ der „Römpp-Online“-Ausgabe

Vorträge

- Mechanistic aspects of a multiproduct sesquiterpene synthase from *Medicago truncatula*; 35. Doktorandenworkshop, Naturstoffe: Chemie, Biologie und Ökologie, Jena, April 2008

- Mechanistic aspects of a multiproduct sesquiterpene synthase from *Medicago truncatula*; 25th Anniversary Meeting of ISCE / International Society of Chemical Ecology, State College, Pennsylvania, USA, August 2008
- Mechanistic aspects of a multiproduct sesquiterpene synthase from *Medicago truncatula*, 6th Kurt Mothes Workshop “Secondary Metabolism”, Jena, September 2008
- Demonstrating an old hypothesis: A new pathway toward 4,10-dimethyl-isopropylloctalin skeletons; ICE Symposium / Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena, Juni 2009
- A new pathway towards cadalane skeletons; Gordon Research Conference on Floral & Vegetative Volatiles, Oxford, England, August 2009

Posterpräsentationen:

- M. Leitner, G.-I. Arimura, S. Garms, A. Mithöfer: *Medicago truncatula* vs. caterpillars; ICE Symposium / Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena, Juli 2005
- G.-I. Arimura, S. Garms, W. Boland: New sesquiterpene synthases from *Medicago truncatula*; SAB Meeting / Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena, Januar 2006
- S. Garms, G.-I. Arimura: New sesquiterpene synthases from *Medicago truncatula*; ICE Symposium / Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena, Juni 2006
- S. Garms, G.-I. Arimura, W. Boland: Functional characterization of terpene synthase from *Medicago truncatula*; 23rd ISCE Meeting / International Society of Chemical Ecology, Jena, Juli 2007
- S. Garms, G.-I. Arimura, W. Boland: Functional characterization of terpene synthase from *Medicago truncatula*; Gordon Research Conference on Floral & Vegetative Volatiles, Les Diablerets, Schweiz, Oktober 2007

- S. Garms, G.-I. Arimura, W. Boland: New sesquiterpene synthases from *Medicago truncatula*; 8th Terpnet Meeting, Strasbourg, Frankreich, Mai 2007
- S. Garms, W. Boland: Keeping or losing control - mechanistic aspects of a multiproduct sesquiterpene synthase; ICE Symposium/ Max-Planck-Institut für chemische Ökologie, Jena, September 2008
- S. Garms, W. Boland: Keep or losing control: mechanistic aspects of a multiproduct sesquiterpene synthase from *Medicago truncatula*; 9th Terpnet Meeting, Tokio, Japan, Mai 2009
- S. Garms, W. Boland: Keep or losing control: mechanistic aspects of a multiproduct sesquiterpene synthase from *Medicago truncatula*; 25th ISCE Meeting / International Society of Chemical Ecology, Neuchatel, Schweiz, August 2009
- S. Garms, W. Boland: Proving an old hypothesis - an alternative pathway towards cadalane skeletons; 22. Irseer Naturstofftage, Kloster Irsee, Februar 2010

8.6 Danksagung

Als erstes möchte ich Prof. Boland für die Überlassung des Themas sowie die gute Betreuung und die vielen hilfreichen Diskussionen danken. Außerdem möchte ich mich für das über die Jahre entgegengebrachte Vertrauen bedanken und für die Möglichkeit an nationalen und internationalen Konferenzen teilzunehmen zu können, die mir ermöglichten meinen wissenschaftlichen und persönlichen Horizont zu erweitern.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Pohnert für die Übernahme der universitären Betreuung der Arbeit, so manches ermutigende Gespräch und das ich durch die Mitarbeit an der Römpp-Onlineausgabe viele neue Aspekte der „Terpenwelt“ kennenlernen durfte.

Weiterhin möchte ich PD Dr. Brandt und Eva Schulze vom Institut für Pflanzenbiochemie in Halle danken, die mir bei der computergestützten Analyse der Terpensynthesen geholfen haben.

Bei Gen-ichiro Arimura möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der Terpensynthasegene bedanken.

Ein besonderer Dank gebührt Tobias Köllner, der mir mit seinen wertvollen Tricks und Kniffen im Umgang mit Terpensynthesen weitergeholfen hat. Ausgedehnte Diskussionen waren die Geburtsstunde vieler neuer Ideen, die mich oft in die entscheidende Richtung wiesen und in einer fruchtbaren Kooperation mündeten.

Bei Herrn Prof. Fürstner, Herrn Egli, Herrn Fehr, Herrn Zündorf und Herrn von Reuss möchte ich mich für die Zusendung von Terpenstandards bedanken, die die tiefgreifenden mechanistischen Untersuchungen der Enzyme überhaupt erst ermöglichten.

Ich danke Stefan Bartram, Andrea Fiedler, Andreas Habel, Sandra Köhn, Tobias Köllner sowie Martin und Anja Schulz, die durch ihre kritischen Bemerkungen zum Manuskript maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt Stefan Bartram und Andreas Habel, die mich über die Jahre begleitet und immer ein offenes Ohr für meine wissenschaftlichen Probleme

hatten. Während dieser Zeit haben sie sich auch außerhalb des Institutes zu wertvollen Menschen entwickelt.

Der gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die großartige Arbeitsatmosphäre danken und die Solidarität, die mir während dieser Zeit entgegengebracht wurde. Besonders bedanken möchte ich mich bei Rita Büchler, Roy Kirsch, Sindy Frick und Sabrina Köpke, die mir in mikrobiologischen und biochemischen Fragestellungen stets beiseite standen.

Sybille Lorenz und Tobias Munde möchte ich für die Hilfe bei den NMR- sowie den HRMS-Messungen danken.

Weiterhin danke ich Andrea Fiedler, Anne Behrend, Christian Kost und allen anderen Teilnehmern der Mensaessensgruppe, die für Abwechslung im wissenschaftlichen Alltag sorgten.

Ich danke Grit Winnefeld die, als gute Seele unserer Abteilung, mir bei der Bewältigung der Bürokratie stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Desweiteren möchte ich Jan Fleischhauer, Katrin Knop, Sandra Köhn, Swen Körsten, Anja Schulz, Martin Schulz, Daniel Tietze und Andreas Wagner und danken, die mir seit dem Studium immer zur Seite standen, mich unterstützten und sich über die Zeit zu hoch geschätzten Freunden entwickelt haben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Freundin Pia, die stets an mich geglaubt hat und die mir auch in schwierigen Zeiten ein sicherer Rückhalt war. Für ihre Kreativität und Hilfe bei der Gestaltung des Deckblattes sei ebenfalls gedankt.

8.7 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Stefan Garms

Anschrift: Am Anger 16
07743 Jena
Tel. 03641/5277367

Geburtsdatum: 07.04.1978

Geburtsort: Gera

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/1984 - 09/1987 Grundschule Ost, Eisenberg

09/1987 - 09/1990 Friedrich-Schiller-Schule, Eisenberg

09/1990 - 06/1996 Staatliches Gymnasium Friedrich Schiller, Eisenberg,
Abschluss mit Abitur

Wehrdienst 07/1996 - 04/1997

Berufsbildung

09/1997 - 06/2000 Ausbildung als Chemielaborant (Fachrichtung Chemie)

30.06.2000 vorzeitiger Abschluss der Ausbildung mit
Facharbeiterbrief

Studium

- 09/2000 - 09/2004 Chemiestudium an der Friedrich-Schiller-Universität (FSU) in Jena
- 10/2004 - 08/2005 Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie (Abteilung Prof. Dr. Boland) und an der FSU Jena

Promotion

- 10/2005 - heute Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für chemische Ökologie Jena (Abteilung Prof. Dr. Boland) und an der FSU Jena

Berufliche Erfahrung

- 07/2000 - 09/2000 Chemielaborant bei Innovent e.V., Jena
- 10/2000 - 12/2003 Laborhilfskraft bei Innovent e.V., Jena
- 12/2003, 02/2004 - 04/2004, 08/2004 - 09/2004, studentische Hilfskraft an der FSU Jena

Jena, den 04.10.2010

.....

Stefan Garms

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Jena, den 04.10.2010

.....

Stefan Garms

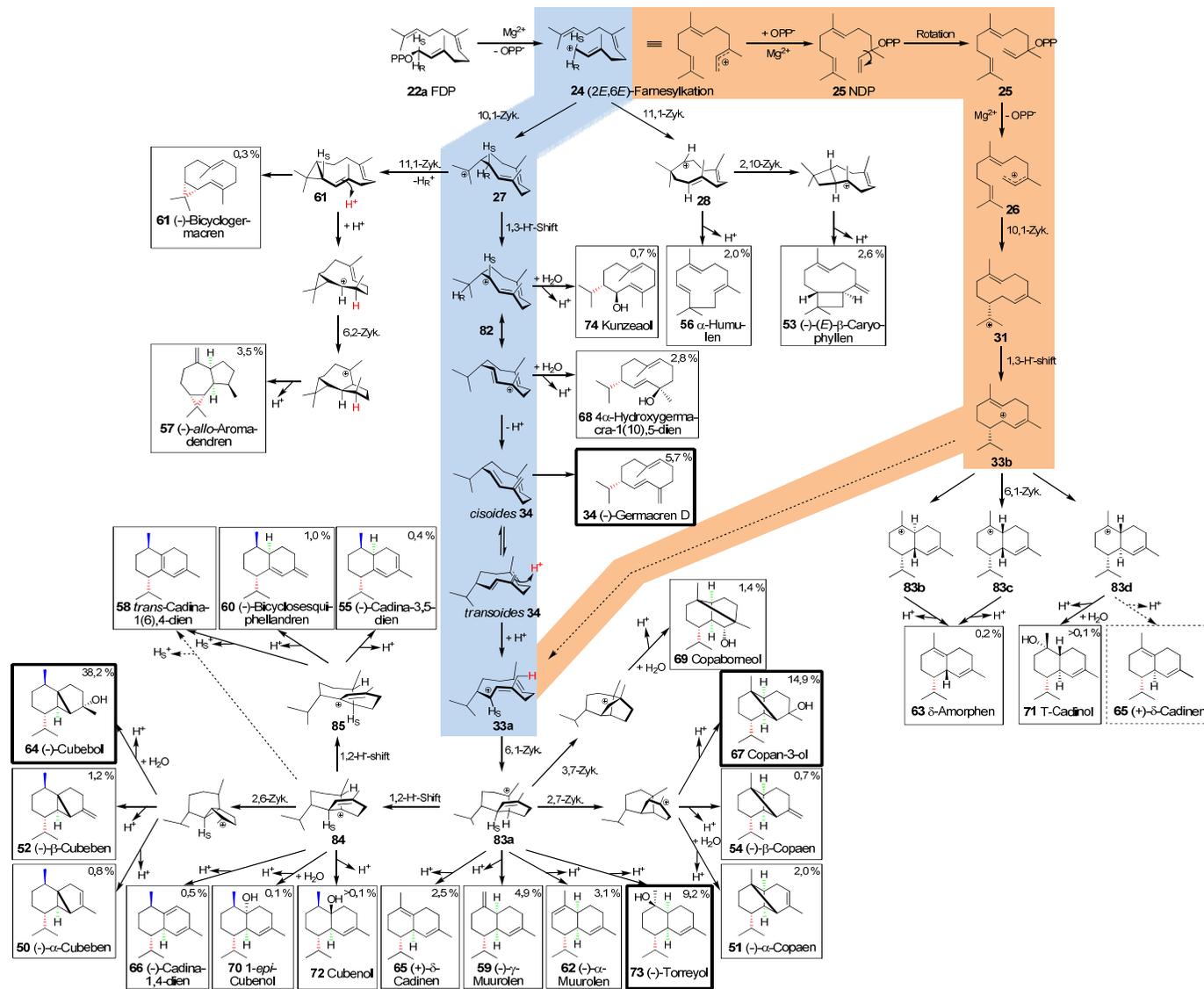
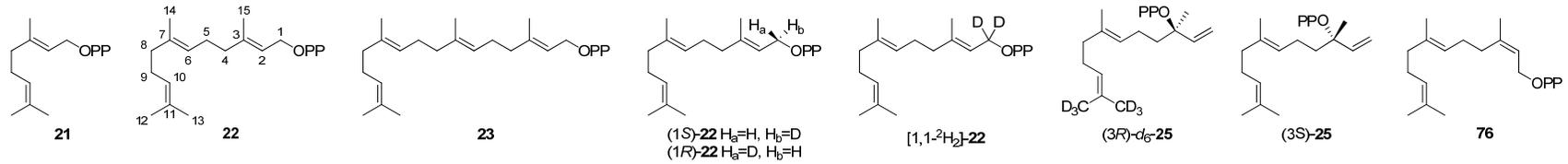
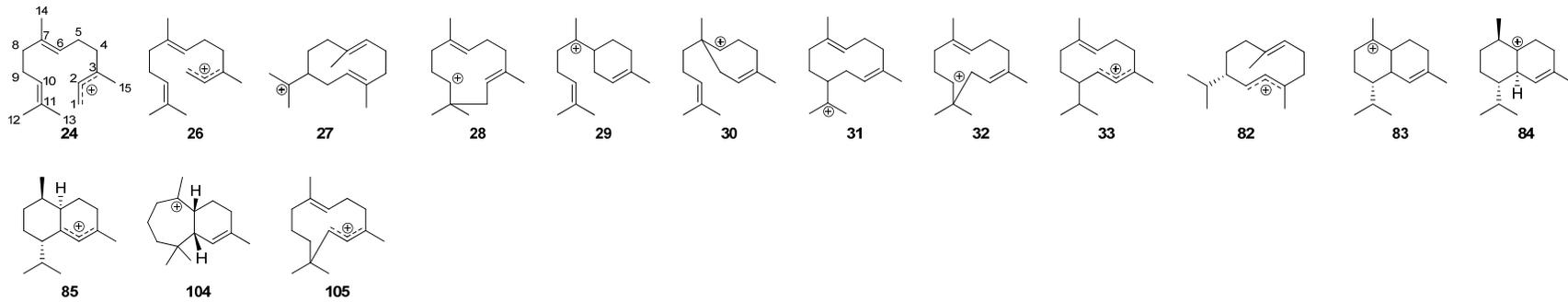


Abb. B-1 (entspricht Abb.43). Hypothetischer Reaktionsmechanismus für die Bildung der Sesquiterpene katalysiert durch MtTPS5. Die Farben rot, blau und grün repräsentieren Stereozentren mit identischen Konfigurationen. Die Bildung des Schlüsselintermediates 33 über die Protonierung von Germacren D (34) ist blau, die über Nolididipospat (25) orange hinterlegt. Die Hauptprodukte sind hervorgehoben (schwarze Boxen)

Substrate



Kationen



Enzymprodukte

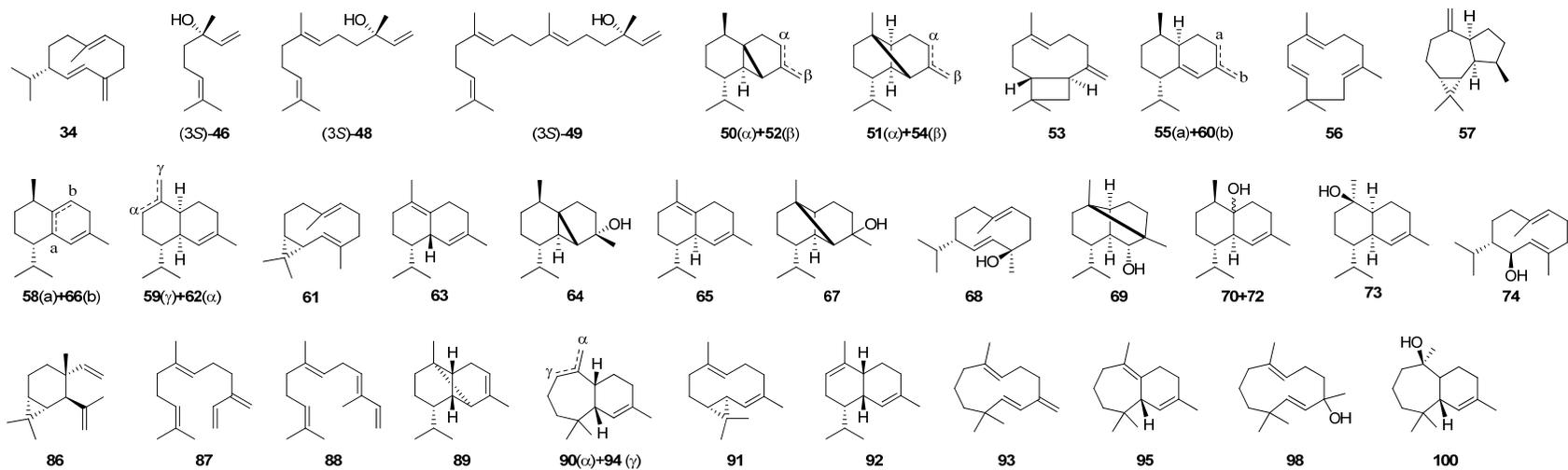


Abb. B-2. Formeln ausgewählter Verbindungen.