

**UNTERSUCHUNG VON HYDROPHOBEN PROTEIN-LIGAND-
WECHSELWIRKUNGEN IN WÄSSRIGER LÖSUNG MITTELS
SATURATION TRANSFER DIFFERENCE NMR AM BEISPIEL DER
ENZYMREAKTION DER (+)-GERMACREN D SYNTHASE**

DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
des Departments Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Thomas Hackl

aus Bad Segeberg

im April 2009

In Erinnerung an meine Eltern und meine Großmutter

„Die Lockerung des Denkens scheint mir der größte Segen, den die heutige Wissenschaft uns gebracht hat. Ist doch der Glaube an eine einzige Wahrheit und deren Besitzer zu sein, die tiefste Wurzel allen Übels auf der Welt.“

Max Born, 1882-1970, Nobelpreis der Physik 1954

1. Gutachter: Prof. Dr. B. Meyer

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. W. Franke

Tag der Disputation: 29. Mai 2009

Der praktische Teil dieser Arbeit wurde von Oktober 2004 bis Juli 2008 im Institut für Organische Chemie, Department Chemie der Universität Hamburg, Leiter Prof. Dr. B. Meyer, durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer danke ich für die freundliche und kurzfristige Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, den Freiraum bei der Gestaltung und die stete Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

| | |
|--|-----------|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | IV |
| LISTE AUSGEWÄHLTER NMR-PARAMETER | VI |
| AMINOSÄUREBEZEICHNUNGEN UND DEREN ABKÜRZUNGEN | VII |
| 1 EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 Hydrophobe Wechselwirkungen in biologischen Systemen | 1 |
| 1.2 Isoprenoide | 3 |
| 1.2.1 Biosynthese von Terpenen in Pflanzen | 5 |
| 1.3 Terpensynthasen | 7 |
| 1.4 (+)-Germacren D Synthase | 10 |
| 1.5 Protein-Prenyltransferasen | 13 |
| 1.6 STD-NMR-Experimente an Enzymsystemen | 16 |
| 1.7 Micellen | 18 |
| 2 METHODEN | 21 |
| 2.1 NMR-Spektroskopie | 21 |
| 2.1.1 <i>Saturation Transfer Difference</i> (STD) NMR-Spektroskopie | 21 |
| 2.1.2 T_1 -Relaxationsmessungen | 25 |
| 2.2 <i>Surface Plasmon Resonance</i> (SPR) | 27 |
| 2.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten von Terpensynthasen mittels radiochemischer Methoden | 29 |
| 2.4 Enzymkinetik von Progresskurven | 30 |
| 2.5 Molecular Modeling | 34 |
| 3 AUFGABENSTELLUNG | 36 |
| 4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION | 37 |
| 4.1 Voruntersuchungen an der (+)-Germacren D Synthase | 37 |
| 4.1.1 Anpassung der Expressionsbedingungen | 37 |
| 4.1.2 Aktivitätsmessungen an der (+)-Germacren D Synthase | 39 |
| 4.1.3 NMR-spektroskopische Voruntersuchungen | 47 |
| 4.2 Charakterisierung der Liganden | 48 |
| 4.2.1 Signalzuordnungen in den ^1H -NMR-Spektren der drei Liganden Farnesylmonophosphat, Farnesyldiphosphat und Germacren D | 50 |
| 4.2.2 Löslichkeitsverhalten von Germacren D | 52 |
| 4.2.3 Löslichkeitsverhalten von Farnesyldiphosphat | 54 |
| 4.2.4 Löslichkeitsverhalten von Farnesylmonophosphat | 66 |
| 4.3 T_1 -Relaxationsmessungen | 71 |
| 4.4 SPR-Studien | 76 |
| 4.5 STD-Experimente an der (+)-Germacren D Synthase | 81 |
| 4.5.1 Bindungsstudie der (+)-Germacren D Synthase mit Farnesylmonophosphat | 81 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 4.5.2 | Untersuchung der Enzymreaktion der (+)-Germacren D Synthase..... | 87 |
| 4.5.3 | Vergleich der Bindungsepitope: Farnesylmono- und Farnesyldiphosphat | 105 |
| 4.6 | Bindungsstudien an der Farnesyltransferase | 106 |
| 4.7 | Molecular Modeling | 112 |
| 4.7.1 | Erstellung eines Homologiemodells der (+)-Germacren D Synthase | 112 |
| 5 | AUSBLICK..... | 124 |
| 6 | ZUSAMMENFASSUNG..... | 125 |
| 7 | SUMMARY..... | 128 |
| 8 | EXPERIMENTELLER TEIL | 131 |
| 8.1 | Chemikalien und Materialien | 131 |
| 8.2 | Vektor für die Transformation der (+)-Germacren D Synthase..... | 135 |
| 8.3 | Molekularbiologische und Proteinchemische Methoden | 136 |
| 8.3.1 | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> BL21DE3 Zellen | 136 |
| 8.3.2 | Protein-Expression | 137 |
| 8.3.3 | Zellaufschluss und Ni-NTA-Affinitätschromatographie | 137 |
| 8.3.4 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 137 |
| 8.3.5 | Comassie-Färbung..... | 138 |
| 8.3.6 | Western-Blot | 139 |
| 8.3.7 | Immunoprinting..... | 139 |
| 8.3.8 | Umpufferung der Enzymlösungen | 139 |
| 8.4 | Enzymassays | 140 |
| 8.4.1 | GC/MS detektiertes Enzymassay | 140 |
| 8.4.2 | Radiochemisches Enzymassay | 140 |
| 8.5 | Synthese des Heptapeptids $^{182}\text{KTKCVIM}^{188}$ aus dem C-Terminus von K-Ras4B | 147 |
| 8.5.1 | Synthese des Peptids | 147 |
| 8.5.2 | Abspaltung vom Harz und Reinigung..... | 148 |
| 8.6 | Vorbereitung der Ligandproben..... | 148 |
| 8.6.1 | Herstellung von FMP- und FDP-Stammlösungen für die Enzymassays, SPR- und NMR-Experimente..... | 148 |
| 8.6.2 | Herstellung der (-)-Germacren D Lösungen für die Löslichkeitsversuche..... | 149 |
| 8.7 | SPR-Bindungsstudien..... | 150 |
| 8.8 | Charakterisierungen der verwendeten Liganden..... | 151 |
| 8.8.1 | Farnesylmonophosphat..... | 153 |
| 8.8.2 | Farnesyldiphosphat..... | 154 |
| 8.8.3 | Germacren D | 154 |
| 8.8.4 | $^{182}\text{KTKCVIM}^{188}$ | 156 |
| 8.9 | T_1 -Relaxationsmessungen | 159 |
| 8.10 | STD-Experimente..... | 160 |
| 8.10.1 | Sättigungsexperimente | 161 |
| 8.10.2 | Artefaktmessungen an (-)-Germacren D | 162 |
| 8.10.3 | Artefaktmessungen an Farnesyldiphosphat..... | 162 |
| 8.10.4 | Artefaktmessungen an Farnesylmonophosphat..... | 167 |

| | | |
|-----------|---|------------|
| 8.10.5 | (+)-Germacren D Synthase mit Farnesylmonophosphat | 169 |
| 8.10.6 | (+)-Germacren D Synthase mit Farnesyldiphosphat | 174 |
| 8.10.7 | Farnesyltransferase | 179 |
| 8.11 | Molecular Modeling | 179 |
| 9 | LITERATURVERZEICHNIS | 182 |
| 10 | ANHANG | 193 |
| 10.1 | Sequenz der (+)-Germacren D Synthase | 193 |
| 10.2 | Modifizierte Pulsprogramme | 194 |
| 10.3 | CLUSTAL W Multiple Alignment | 201 |
| 10.4 | Daten des Homologymodeling | 203 |
| 10.5 | Proton-Proton-Abstände des Farnesyldiphosphat | 209 |
| 10.6 | Skripte, die im Programm R verwendet wurden | 218 |
| 10.7 | Gefahrstoffanhang | 221 |
| | LEBENS LAUF | 223 |
| | WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN | 224 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-----------------------|---|
| 1D, 2D | ein-, zweidimensional |
| Ac ₂ O | Essigsäureanhydrid |
| Acetyl-CoA | Acetyl-Coenzym A |
| AS | Aminosäure |
| Boc | <i>tert</i> -Butyloxycarbonyl |
| CoA | Coenzym-A |
| COSY | <i>Correlation Spectroscopy</i> |
| CMC | <i>critical micelle concentration</i> |
| ddH ₂ O | <i>double distilled water</i> |
| DHB | 2,5-Dihydroxybenzoesäure |
| DIPEA | <i>N,N</i> -Diisopropylethylamin |
| DMADP | Dimethylallyldiphosphat |
| DMF | <i>N,N</i> -Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| <i>d</i> TBS | <i>deuterated tris buffered saline</i> |
| FID | <i>Free Induction Decay</i> |
| Fmoc | 9-Fluorenylmethoxycarbonyl |
| FDP | Farnesyldiphosphat |
| FHP | Farnesylhydroxyphosphonat |
| FMP | Farnesylmonophosphat |
| GA-3P | Glycerinaldehyd-3-phosphat |
| GC | Gaschromatographie |
| (-)-GD | (-)-Germacren D |
| (+)-GD | (+)-Germacren D |
| GDP | Geranyldiphosphat |
| (+)-GDS | (+)-Germacren D Synthase |
| GGDP | Geranylgeranyldiphosphat |
| HPLC | <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| HSQC | <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> |
| HMBC | <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> |
| IDP | Isopentenylidiphosphat |
| <i>k</i> ₁ | Geschwindigkeitskonstante der Assoziation |

| | |
|------------------|---|
| k_{-1} | Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation |
| k_2 | Geschwindigkeitskonstante des Reaktionsumsatzes eines Enzyms |
| k_{cat} | Wechselzal eines Enzyms |
| K_D | Gleichgewichtskonstante der Dissoziation |
| MALDI-TOF | <i>Matrix Assisted Laser Desorption / Ionisation - Time of Flight</i> |
| MeCN | Acetonitril |
| MS | Massenspektrometrie |
| MW | <i>molecular weight</i> |
| NHS | <i>N</i> -Hydroxysuccinimid |
| NOE | <i>Nuclear Overhauser Effect</i> |
| NOESY | <i>Nuclear Overhauser Effect and Exchange Spectroscopy</i> |
| RMSD | <i>root mean square distance</i> |
| RP | <i>reversed phase</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| RU | <i>resonance unit</i> |
| <i>S/N</i> | <i>signal to noise ratio</i> |
| SDS | Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecylsulfate</i>) |
| SPR | <i>Surface Plasmon Resonance</i> |
| STD | <i>Saturation Transfer Difference</i> |
| TBS | <i>tris buffered saline</i> |
| TBTU | <i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoroborat |
| TFA | Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>) |
| TFE | 2,2,2-Trifluorethanol |
| TIPS | Triisopropylsilan |
| TOCSY | <i>Total Correlation Spectroscopy</i> |
| TPPI | <i>Time Proportional Phase Increment</i> |
| <i>v/v</i> | Volumen zu Volumen |
| <i>w/v</i> | Gewicht zu Volumen |
| WATERGATE | Water Suppression by Gradient Tailored Excitation |

LISTE AUSGEWÄHLTER NMR-PARAMETER

| | |
|----------------|--|
| CNST2 | $^1J_{X,H}$ -Kopplungskonstante |
| CNST13 | <i>long range</i> C,H-Kopplungskonstante |
| CPDPRG2 | Entkopplungssequenz |
| D1 | Relaxationsdelay |
| D19 | <i>delay for binominal water suppression</i> (WATERGATE) |
| D2 | $(1/2J)$ XH |
| D20 | <i>saturation time</i> (STD-Experiment) |
| D24 | $(1/8J)$ XH |
| D29 | <i>spinlock time</i> |
| D4 | $(1/4J)$ XH |
| D8 | NOE/ROE <i>mixing time</i> |
| DS | <i>dummy scans</i> |
| L4 | <i>number of averages = (total number of scans) / NS</i> |
| NS | <i>number of scans</i> |
| <i>off-res</i> | Einstrahlfrequenz des <i>off-resonance</i> Pulses |
| <i>on-res</i> | Einstrahlfrequenz des <i>on-resonance</i> Pulses |
| PL9 | <i>presaturation pulse</i> |
| PL10/29 | <i>power level for TOCSY-spinlock / trim pulse</i> |
| SP1 | <i>shaped pulse 180 degree (excitation sculpting)</i> |
| SP13 | <i>shaped pulse for saturation</i> |
| SW | <i>sweep width</i> |
| TD(F1) | <i>size of FID in F1</i> (Inkremente) |

AMINOSÄUREBEZEICHNUNGEN UND DEREN ABKÜRZUNGEN

| Aminosäure | Abkürzung | Code |
|----------------|-----------|------|
| Alanin | Ala | A |
| Arginin | Arg | R |
| Asparagin | Asn | N |
| Asparaginsäure | Asp | D |
| Cystein | Cys | C |
| Glutamin | Gln | Q |
| Glutaminsäure | Glu | E |
| Glycin | Gly | G |
| Histidin | His | H |
| Isoleucin | Ile | I |
| Leucin | Leu | L |
| Lysin | Lys | K |
| Methionin | Met | M |
| Phenylalanin | Phe | F |
| Prolin | Pro | P |
| Serin | Ser | S |
| Threonin | Thr | T |
| Tryptophan | Trp | W |
| Tyrosin | Tyr | Y |
| Valin | Val | V |

1 EINLEITUNG

1.1 Hydrophobe Wechselwirkungen in biologischen Systemen

Hydrophobe Wechselwirkungen spielen bei vielen Prozessen in biologischen Systemen eine zentrale Rolle. Ihre Wirkung zeigt sich bei der Proteinfaltung, der Selbstorganisation von Lipiden zu den biologischen Membranen und bei molekularen Erkennungsprozessen. Eine Vielzahl hydrophober Liganden stellen Agonisten oder Antagonisten rezeptorvermittelter Prozesse dar und in den Lipidstoffwechselwegen werden hydrophobe Substrate von Stoffwechsellzymen umgesetzt. Dabei bezeichnet der Begriff der „hydrophoben Wechselwirkungen“ zunächst die Tendenz von unpolaren Molekülen in wässrigem Medium zu aggregieren. Eng verknüpft mit diesem Begriff ist die „hydrophobe Hydratation“, die das Löslichkeitsverhalten solcher Verbindungen in Wasser beschreibt. Beide Begriffe werden unter dem Namen der „hydrophoben Effekte“ zusammengefasst.¹⁻³

Diese Definitionen der hydrophoben Effekte klingen im Hinblick auf molekulare Erkennungsprozesse ungewohnt, da sie nicht wie bei den elektrostatischen oder polaren Wechselwirkungen die Kraft zwischen den Bindungspartnern, sondern das Verhalten in wässriger Lösung in den Vordergrund stellen. Die hydrophoben Effekte beruhen zwar auf den van-der-Waals-Kräften, diese stellen aber nur schwache Wechselwirkungen dar. Ein Vergleich der Bindungsenergien im Vakuum verdeutlicht das Verhältnis der bei den verschiedenen Bindungstypen auftretenden Kräfte (Tabelle 1).⁴

Tabelle 1: Vergleich der Bindungsenergien kovalenter und nichtkovalenter Wechselwirkungen im Vakuum. Die angegebenen Werte sind Richtwerte und hängen von den wechselwirkenden Partnern ab.

| Bindungstyp | Länge [nm] | Bindungsenergie im Vakuum [kJ/mol] |
|------------------------------|------------|------------------------------------|
| Kovalente Bindung | 0.15 | -350 |
| Ionenpaar-Bindung | 0.25 | -250 |
| Wasserstoffbrückenbindung | 0.30 | -15 |
| van-der-Waals-Wechselwirkung | 0.35 | -1 |

Um die Bedeutung der hydrophoben Wechselwirkungen in biologischen Systemen zu verstehen, muss die Tatsache berücksichtigt werden, dass alle Prozesse in wässriger Lösung

ablaufen. Ferner beruhen die molekularen Wechselwirkungen nicht nur auf den Bindungsenergien, sondern die gesamte freie Enthalpie des Bindungsprozesses muss berücksichtigt werden. Diese setzt sich aus den verschiedenen Beiträgen der Enthalpie und Entropie des Prozesses zusammen.³

Die hydrophobe Hydratation bezeichnet den Effekt, dass sich in Wasser eine Art Käfig um ein hydrophobes Molekül bildet, der aus mehreren Schichten von Wassermolekülen bestehen kann. Die resultierende Entropieerniedrigung des Systems ist verantwortlich für die geringe Löslichkeit solcher Substanzen. Bindet ein hydrophobes Molekül an ein Protein, treten zwei Effekte auf. Erstens muss Wasser aus der Bindungsstelle im Protein verdrängt werden, zweitens muss die Käfigstruktur des Wassers um das hydrophobe Molekül aufgebrochen werden. Beides führt zu einer Erhöhung der Entropie, da sich die Anzahl der Freiheitsgrade der vorher gebundenen Wassermoleküle erhöht. Die Stärke von hydrophoben Wechselwirkungen liegt somit nicht in einem hohen Beitrag zur Bindungsenergie begründet, sondern ist von entropischer Natur. Der Gewinn an freier Bildungsenthalpie ist quantitativ schwer vorhersagbar und Gegenstand vieler experimenteller und theoretischer Arbeiten.^{2,5-7} In erster Näherung hängt der energetische Gewinn von der Zahl der freigesetzten Wassermoleküle ab. Die Anzahl ist näherungsweise proportional zu der hydrophoben Oberfläche, die dem Wasser nach der Bindung des hydrophoben Liganden nicht mehr zugänglich ist. Dem steht eine Erniedrigung der Freiheitsgrade des Liganden bei der Bindung an das Protein gegenüber. Der Entropieterm hydrophober Wechselwirkungen kann je nach Ligand-Protein-System einen ebenso großen Beitrag zur freien Enthalpie liefern, wie die Bindungsenergien der elektrostatischen oder polaren Wechselwirkungen.³

Nicht nur die Beschreibung der hydrophoben Effekte und deren Quantifizierung stellen wissenschaftlich eine große Herausforderung dar. So ist die Zahl potentieller lipophiler Wirkstoffkandidaten in den letzten Jahren angestiegen, woraus sich ein Bedarf für Methoden ergibt, mit denen zuverlässige Daten über solche Wechselwirkungen erhalten werden können.⁸ Die Probleme liegen bei solchen Studien aber nur bedingt auf der Seite der Methoden. Es gibt eine Reihe von verschiedenen Ansätzen, mit denen Daten über die Wechselwirkung von kleinen organischen Molekülen mit biologischen *targets* erhalten werden können. Je nach Ansatz sind Daten über die Bindungsart, Bindungsstärke, über molekulare Details auf Seiten des Liganden sowie auf der des Makromoleküls zugänglich. Somit resultieren Probleme zunächst aus der Handhabung hydrophober Substanzen. Liegen die Bindungskonstanten bei der Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen in

einem Bereich, in dem eine vollständige Löslichkeit der zu untersuchenden Liganden nicht mehr gewährleistet ist, kann die Bestimmung solcher Daten unmöglich werden. Die Notwendigkeit Proteinstrukturen durch physiologische Elektrolytkonzentrationen stabilisieren zu müssen, kann sich zusätzlich negativ auf das Löslichkeitsverhalten hydrophober Substanzen auswirken. Hydrophobe und vor allem amphiphile Verbindungen zeigen ein ausgeprägtes Aggregationsverhalten. Dieses kann sich störend auf biologische Aktivitätsassays auswirken und die Messergebnisse beeinflussen, da die Proteinbindung in Konkurrenz zu Bindungsereignissen mit den Aggregaten steht. Aufgrund der vorrangig entropischen Natur der Bindung des Liganden an das Protein, kann die Tendenz unspezifische Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche einzugehen im Vergleich zu hydrophilen Substanzen deutlich erhöht sein.

1.2 Isoprenoide

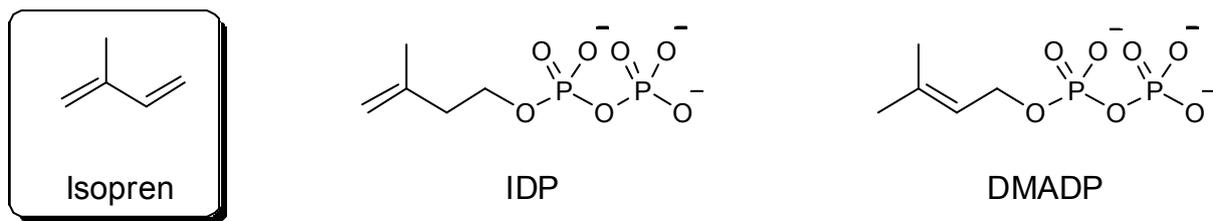


Abbildung 1: Das Isopren stellt rein formal die monomere Einheit der Isoprenoide dar. In der Biosynthese der Isoprenoide existieren zwei zelluläre Formen des Isoprens, das Isopentenylidiphosphat (IDP) und das Dimethylallyldiphosphat (DMADP).

Die Terpene bilden mit den Steroiden und Carotinoiden die große Gruppe der Isoprenoide, von denen heute mehrere zehntausend Verbindungen bekannt sind.^{9;10} Rein formal bildet das 2-Methyl-1,3-butadien (Isopren) den Grundkörper der Isoprenoide, die als dessen Oligomere aufgefasst werden können. Die Identifizierung der zellulären Isopren-Äquivalente in ihrer phosphorylierten Form, das Isopentenylidiphosphat (IDP) und das Dimethylallyldiphosphat (DMADP), gehen auf Arbeiten von Lynen und Bloch zurück.^{11;12} Vom IDP und DMADP leiten sich einige höhermolekulare Diphosphate ab. Die wichtigsten sind das Geranyl diphosphat (GDP, $2 \times C_5$), das Farnesyl diphosphat (FDP, $3 \times C_5$) und das Geranylgeranyl diphosphat (GGDP, $4 \times C_5$). Nahezu alle Terpene lassen sich auf eine dieser Vorstufen zurückführen (Abbildung 2).

Grundsätzlich werden die Terpene nach der Anzahl der Isoprenreste, aus denen sie aufgebaut sind, in Hemi- ($1 \times C_5$), Mono- ($2 \times C_5$), Sesqui- ($3 \times C_5$), Di- ($4 \times C_5$), Sester- ($5 \times C_5$),

Tri- ($6 \times C_5$), Tetra- ($8 \times C_5$) und hochmolekulare Polyterpene eingeteilt. Verbindungen, die sich von einer der Terpenklassen durch Abbau von Alkylgruppen ableiten, werden Norterpene genannt. Beispiele hierfür sind die Steroide. Sie spielen als Hormone bei interzellulären Regulationsprozessen im tierischen Organismus sowie bei der Stabilisierung von Membranen eine wichtige Rolle. Die Carotenoide (Tetraterpene) bilden die größte Gruppe natürlicher Farbpigmente und kommen in allen Lebewesen vor. Ferner gibt es gemischte Isoprenoide, wie die Chlorophylle und Ubichinone, die neben dem isoprenoiden Teil zusätzliche Bausteine enthalten.¹³ Prenylierte Proteine, z.B. Ras und andere kleine G-Proteine, sind an wichtigen Zellregulationsprozessen beteiligt.¹⁴

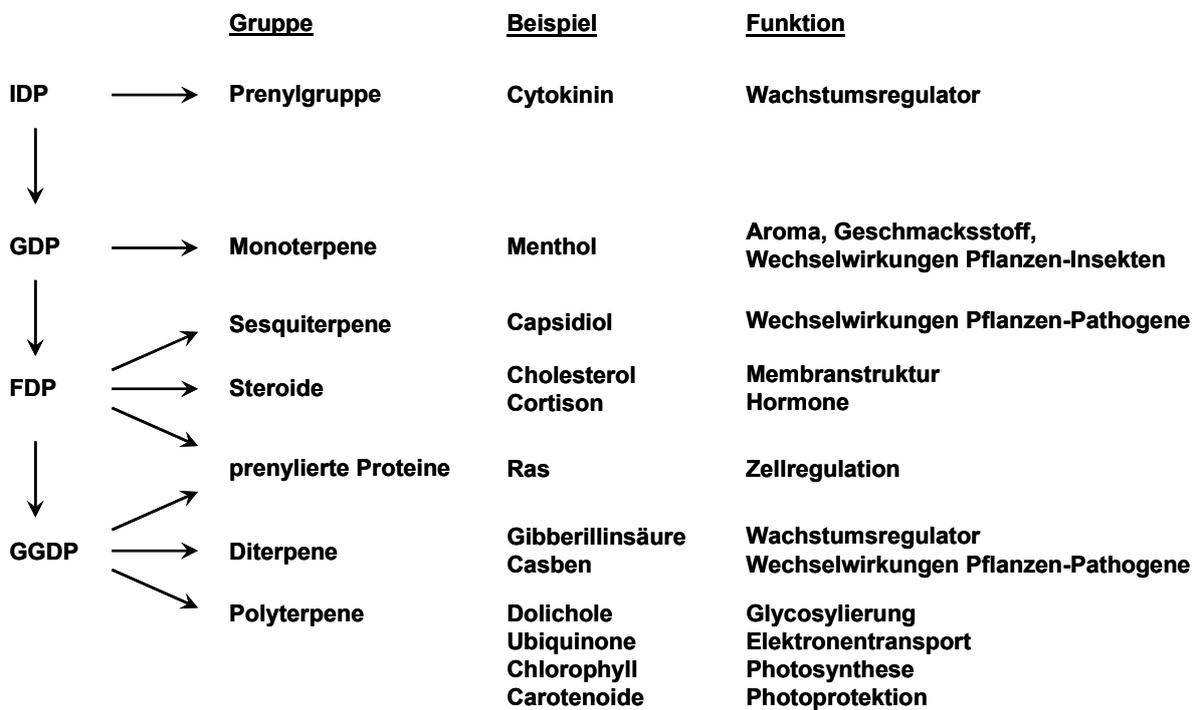


Abbildung 2: Übersicht über die Isoprenoide und ihrer biosynthetischen Vorstufen. Für jede Klasse sind Beispiele für Vertreter sowie deren biologische Funktion aufgeführt. Einige der Stoffwechselprodukte stellen essentielle biologisch aktive Substanzen dar, die mehr oder weniger ubiquitär in allen Organismen vorkommen (Steroide, Polyterpene). Vertreter der Mono-, Sesqui- und Diterpene sind dagegen oft auf wenige Arten beschränkt und zählen zu den typischen Produkten des Sekundärstoffwechsels. Die Prenyldiphosphate, Isopentenylidiphosphat (IDP), Geranyldiphosphat (GDP), Farnesyldiphosphat (FDP) und Geranylgeranyldiphosphat (GGDP) bilden die Vorstufen der einzelnen Terpenklassen und Isoprenoide. Letztlich lassen sich alle isoprenoiden Verbindungen auf das IDP als kleinste Grundeinheit zurückführen.¹⁵

Über die biologische Funktion der niederen Terpene ist noch immer vergleichsweise wenig bekannt. Ihr Vorkommen kann auf wenige Arten oder auf nur eine Gattung beschränkt sein. Pflanzen nutzen Terpene sowohl als Lockstoffe (Duft- und Farbstoffe) als auch zum Schutz

vor Fressfeinden (Duft- und Geschmacksstoffe, Toxine). Einigen Terpenen konnte eine wichtige Rolle als Phytohormone und Wachstumsregulatoren nachgewiesen werden. Insekten nutzen Terpene als Pheromone, zur chemischen Kommunikation sowie als Regulatoren während ihrer Entwicklung.^{16,17}

1.2.1 Biosynthese von Terpenen in Pflanzen

Die Abbildung 3 zeigt eine vereinfachte Übersicht der Biosynthese pflanzlicher Terpene. Diese verläuft in unterschiedlichen Kompartimenten auf unterschiedlichem Wege. Im Cytosol entstehen das IDP und das DMADP auf dem Mevalonatbiosyntheseweg, welcher zunächst von der Kondensation zweier Acetyl-CoA Einheiten zum Acetoacetyl-CoA ausgeht. Durch Kondensation einer weiteren Acetyl-CoA Einheit und anschließender Reduktion entsteht das (*R*)-Mevalonat mit sechs Kohlenstoffatomen. Durch zweimalige Phosphorylierung und anschließende Decarboxylierung wird das IDP als Endprodukt erhalten. Dieses kann durch Einwirken der IDP-Isomerase in das DMADP umgewandelt werden. In den Plastiden (Chloroplasten, Chromoplasten, etc.) dagegen verläuft die Biosynthese auf dem 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP)-Weg. Dieser geht von Glycerinaldehyd-3-phosphat und Pyruvat aus, das im ersten Schritt decarboxyliert wird. Kondensation führt zu der Pentose 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat und durch Umlagerung und anschließende Reduktion zum 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat. Durch die Einwirkung mehrerer Enzyme entsteht schließlich ein cyclisches Diphosphat, das durch zweimalige Reduktion in die beiden Produkte IDP und DMADP umgewandelt wird.¹⁸

Die Biosynthese der acyclischen Vorstufen der einzelnen Terpenklassen durch Kondensation von IDP und DMADP hängt ebenfalls von der Lokalisation in der Zelle ab. Das FDP wird hauptsächlich im Cytosol produziert, GDP und GGDP in den Plastiden. Zu den cytosolischen Isoprenoiden zählen somit die Triterpene, Steroide und die meisten Sesquiterpene. Aus dem MEP-Weg gehen die plastidären Isoprenoide hervor, die Mono- und Diterpene, einige Sesquiterpene, die Carotinoide sowie die Prenylseitenketten des Chlorophylls und der Plastochinone. Es gibt Beispiele für eine Kooperation zwischen beiden Wegen, insbesondere bei der Biosynthese von Stressmetaboliten.¹⁸⁻²⁰

Außer in Pflanzen findet man die kompartimentierte Biosynthese über den Mevalonat- und den MEP-Weg auch in Rotalgen. In Säugetieren wurde bislang nur der Mevalonat-Biosyntheseweg nachgewiesen. Die meisten Bakterien sind nur zu einem der Wege befähigt,

der Mevalonat-Weg ist charakteristisch für Archaeobakterien, der MEP-Weg für Eu- und Cyanobakterien. In Grünalgen wird nur der MEP-Weg realisiert.²¹

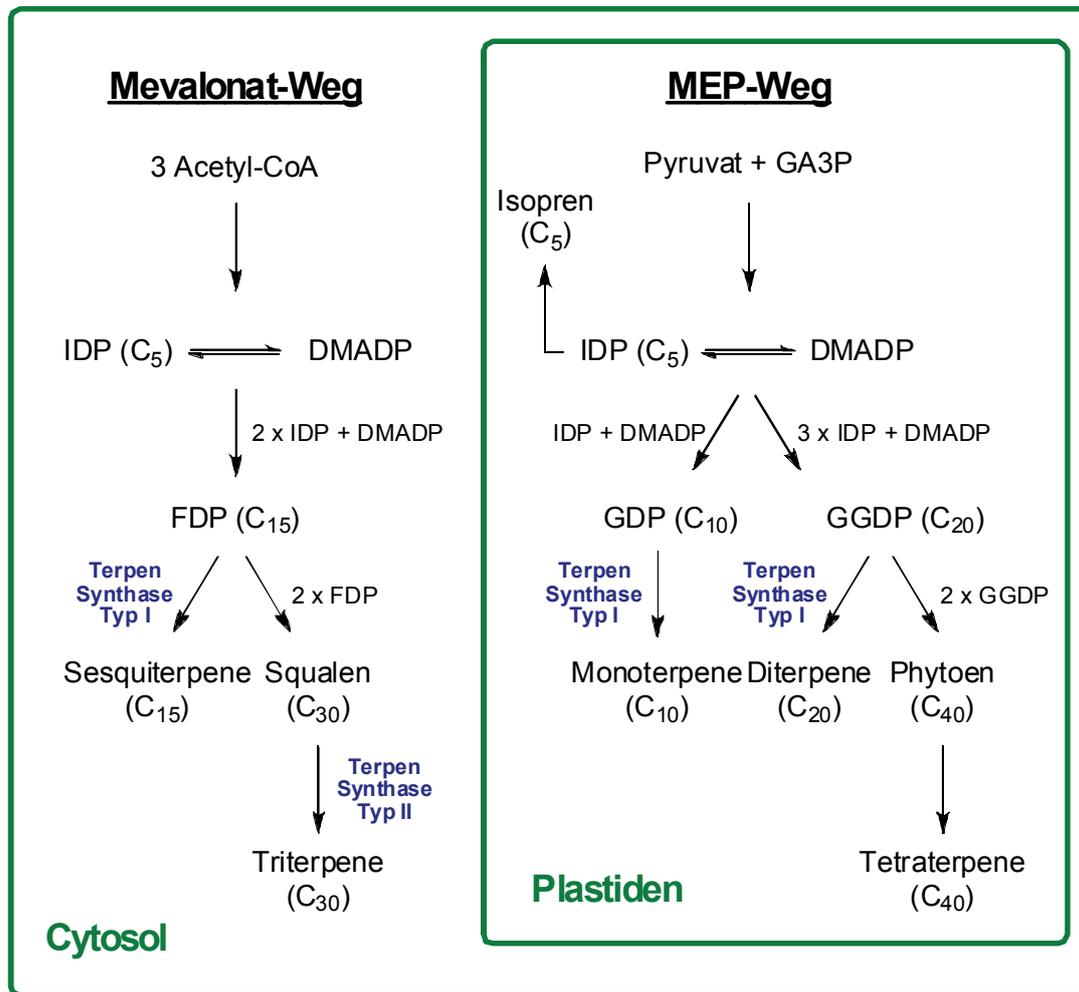


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Biosynthesewege der Isoprenoide in Pflanzen. Der klassische bzw. Mevalonat-Weg läuft im Cytosol ab. Das IDP und DMADP werden aus drei Acetyl-CoA-Einheiten gebildet. Durch Kondensation von zwei Molekülen IDP und einem DMADP entsteht das FDP als Vorläufer der Sesqui- und Triterpene. Auf dem 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat (MEP)-Weg, der in den Plastiden abläuft, geht die Biosynthese des IDP und des DMADP von Pyruvat und Glycerinaldehyd-3-phosphat (GA3P) aus. Die Kondensation der entsprechenden monomeren Bausteine führt zum GDP, Vorstufe der Monoterpene und zum GGDP, Vorstufe der Di- und Tetraterpene. An der Biosynthese der Mono-, Sesqui-, Di- und Triterpenene sind die Terpensynthasen (Abschnitt 1.3) beteiligt.

1.3 Terpensynthesen

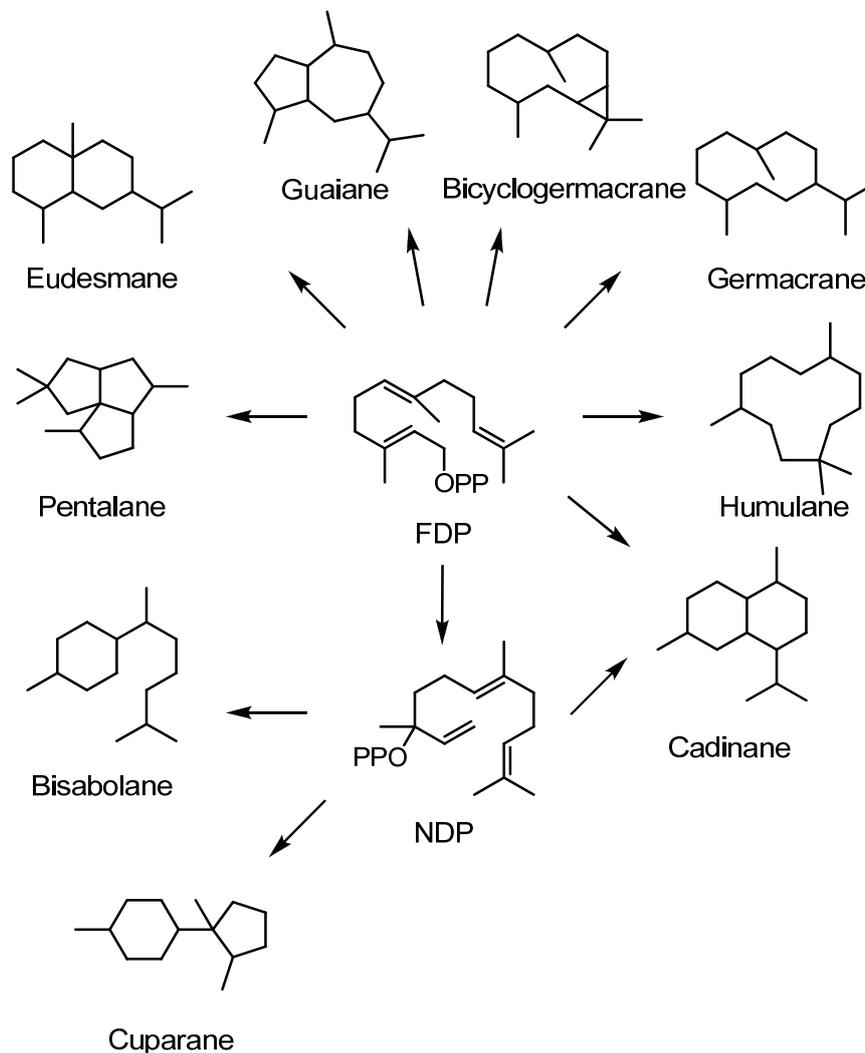


Abbildung 4: Vielfalt der durch die Terpensynthesen katalysierten Reaktionen, gezeigt am Beispiel der Sesquiterpene. Farnesyldiphosphat stellt das Substrat aller Sesquiterpensynthesen dar. Durch Cyclisierungs- und Umlagerungsreaktionen werden unterschiedliche mono-, di- und tricyclische Kohlenwasserstoffe erhalten. Die Bildung einiger Terpengerüste erfordert eine der Cyclisierungsreaktion vorgelagerte Isomerisierung zum Nerolidyldiphosphat (NDP).

Die Terpensynthesen, die auch Terpenyclasen genannt werden, gehören zu einer Klasse von Enzymen, die die Bildung der Mono-, Sesqui-, Di- und Triterpene katalysieren. Sie sind in der Lage aus den Substraten GDP, FDP und GGDP sowie dem Squalen, dem Vorläufermolekül der Triterpene, mehrere hundert Kohlenstoffgerüste herzustellen. Alleine für die Sesquiterpene, die mit mehreren tausend Vertretern die vielfältigste Stoffklasse unter den Terpenen darstellen, sind mehr als 300 Grundkörper bekannt. Die von den Terpensynthesen katalysierten Reaktionen verlaufen fast immer hochspezifisch und stets hochstereoselektiv. Bezüglich der Spezifität gibt es einige exotische Enzyme, wie die δ -Cadinen Synthase und die

γ -Humulen Synthase, die das Farnesyldiphosphat in 34 bzw. 52 Produkte umsetzen. Die Lanosterol Synthase dagegen cyclisiert das (*S*)-2,3-Oxidosqualen zu genau einem von 128 möglichen Stereoisomeren des Lanosterols.^{9;22}

Abhängig vom Mechanismus und der Tertiärstruktur unterscheidet man zwei Arten von Terpensynthasen. Die ionisierungsabhängigen Terpensynthasen (Typ I) beginnen die katalysierte Reaktion mit der metallinduzierten Abspaltung der Diphosphatgruppe. Hierzu zählen die Mono-, Sesqui-, Diterpensynthasen. Die protonierungsabhängigen Terpensynthasen (Typ II) protonieren im ersten Schritt eine Epoxidgruppe oder eine C=C-Doppelbindung. Ein Beispiel stellt die Lanosterol Synthase dar. Beide Initiierungsreaktionen erzeugen im ersten Schritt ein hochreaktives Carbeniumion, das dann weitere Reaktionsschritte durchläuft. Die den Folgereaktionen zugrunde liegenden Prinzipien sind für alle Enzyme gleich. Zunächst findet eine Cyclisierung statt, an die sich mehrere Umlagerungsschritte, wie Methyl- und Hydridverschiebungen, Wagner-Meerwein-Umlagerungen sowie weitere Cyclisierungsschritte anschließen können. Die Reaktionskaskade wird in der Regel durch eine Deprotonierung abgeschlossen.⁹ Manche Reaktionen erfordern vor Abspaltung der Diphosphatgruppe eine Isomerisierung, wie die des Farnesyldiphosphats zum Nerolidyldiphosphat. Im Gegensatz zum FDP besitzt das Nerolidyldiphosphat die nötige Flexibilität um auch Sechs- oder Siebenringe auszubilden.^{22;23}

Alle Terpensynthasen, von den bakteriellen bis zu den pflanzlichen, besitzen eine ähnliche Tertiärstruktur (Abbildung 5). Für den Typ I ist eine hauptsächlich α -helikale Struktur charakteristisch, der Typ II besitzt ein mit dem Typ I nicht verwandtes α -barrel Motiv. Pflanzliche ionisierungsabhängige Terpensynthasen zeichnen sich durch zwei Domänen aus, eine vom Typ I und eine vom Typ II Faltungsmotiv. Katalytisch aktiv ist dabei nur die Typ I Domäne, für die Typ II Domäne konnte bislang keine Aktivität nachgewiesen werden.

Das aktive Zentrum der Typ I Terpensynthasen ist der amphiphilen Struktur der Substrate angepasst. Die Kohlenwasserstoffketten werden in einem mit hydrophoben Resten angereicherten Teil des aktiven Zentrums gebunden. Dessen Tertiärstruktur dient als *template* und bestimmt die bioaktive Konformation des gebundenen Substrats. Die Substratkonformation wiederum besitzt einen entscheidenden Einfluss auf die Produktspezifität. Die Diphosphatgruppe wird in einem polaren Teil des aktiven Zentrums gebunden. Zwei Struktur motive bilden die Bindungsstelle für drei zweiwertige Metallionen. Generell fungieren Magnesium und/oder Mangan als Cofaktor. Welche Spezies unter

physiologischen Bedingungen beteiligt ist, konnte bislang nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die erste bindende Peptidsequenz, das **DDXXD/E**-Motiv, koordiniert zwei der Metallionen, das so genannte **NSE/DTE**-Motiv mit der Consensussequenz **(L,V)(V,L,A)(N,D)D(L,I,V)X(S,T)XXXE** das dritte Metallion (die an der Koordination beteiligten Aminosäuren sind durch Markierung hervorgehoben). Der Vergleich verschiedener Röntgenstrukturen von Terpensynthasen mit Diphosphat-enthaltenden Substratanaloga deutet darauf hin, dass Variationen in den beiden Motiven zu leichten Veränderungen in den Bindungsmodi der Metallionen führen können. Möglicherweise spiegeln diese Abweichungen eine zusätzliche Strategie zur Erhöhung der evolutionsbedingten Diversität von Terpensynthasen wieder.^{9;22}

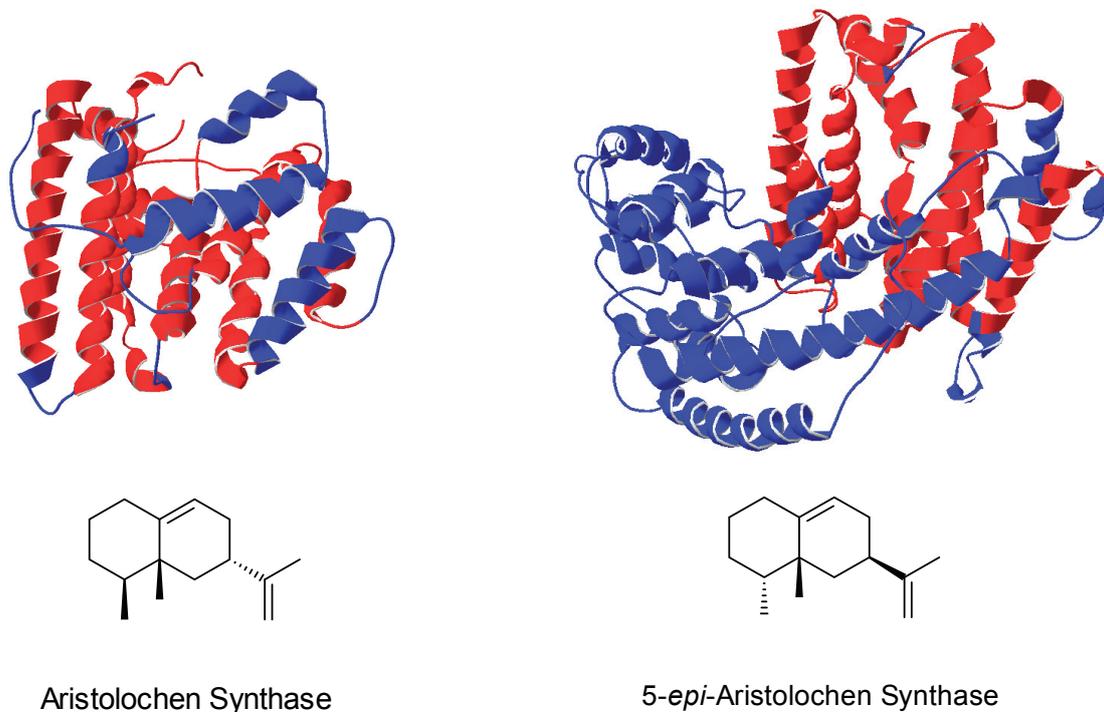


Abbildung 5: Tertiärstrukturen der Aristolochen Synthase aus dem Mikroorganismus *Penicillium roqueforti* und der 5-*epi*-Aristolochen Synthase aus der Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*). In rot dargestellt ist das Typ I Faltungsmotiv der Terpensynthasen. Dieser Bereich liegt strukturell hochkonserviert vor. So beträgt für die hier gezeigten Strukturen der RMSD der C- α Atome 3.1 Å, die Zahl ähnlicher Aminosäuren 222.²⁴

Abbildung 6 zeigt das aktive Zentrum der 5-*epi*-Aristolochen Synthase aus einer Röntgenstruktur (PDB-ID: 5EAT). Gebunden im aktiven Zentrum ist Farnesylhydroxyphosphonat (FHP), ein Substratanalogon des Farnesyldiphosphats. Man erkennt deutlich die chelatartige Bindung von zwei Magnesiumionen durch das DDXXD-Motiv. Das dritte Magnesiumion wird durch die Reste D444, T448 und E452 koordiniert.

Einige Wassermoleküle sind an der Koordination der Magnesiumionen beteiligt. Der Farnesylrest ist in einem mit unpolaren und aromatischen Aminosäuren angereicherten Teil des aktiven Zentrums gebunden. Er nimmt eine Konformation ein, die nach Abspaltung der Diphosphateinheit im nativen Substrat, die Reaktionszentren für eine Cyclisierung zusammenbringt.²⁵

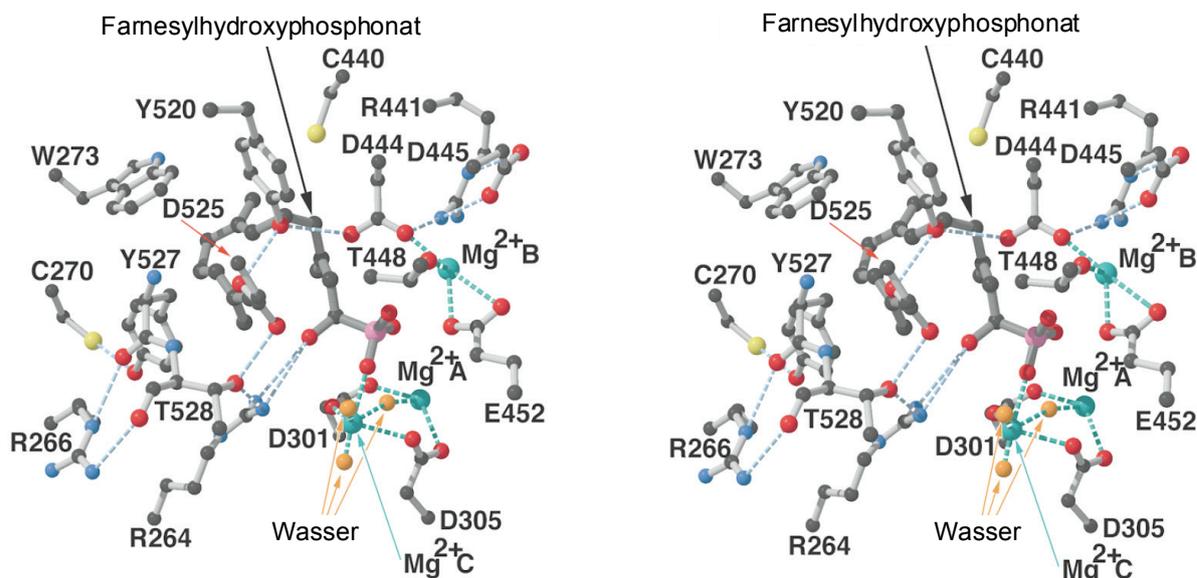


Abbildung 6: Stereodarstellung von Farnesylhydroxyphosphonat gebunden im aktiven Zentrum der 5-*epi*-Aristolochene Synthase (*N. tabacum*). Das aktive Zentrum besteht aus einem polaren phosphatbindenden Teil und einer mit hydrophoben Aminosäuren angereicherten Tasche, welche die Farnesyleinheit in einer gefalteten Konformation bindet und das Reaktionszentrum vor Wasser abschirmt. Blaue gestrichelte Linien zeigen Wasserstoffbrücken, grün gestrichelte metallkoordinierende Bindungen.²⁵

1.4 (+)-Germacren D Synthase

Bei der (+)-Germacren D Synthase handelt es sich um eine Sesquiterpensynthase, die die Bildung von (+)-Germacren D aus Farnesyldiphosphat katalysiert. (+)-Germacren D ist einer der Hauptbestandteile des ätherischen Öls der kanadischen Goldrute (*Solidago canadensis*; *Asteraceae*). *S. canadensis* ist vom wissenschaftlichen Standpunkt insofern interessant, da die Pflanze beide Enantiomere des Sesquiterpens Germacren D produziert. Da die Natur bezüglich biokatalytischer Reaktionen hochstereoselektiv ist, wurde vermutet dass beide Enantiomere durch jeweils eine spezifische Synthase synthetisiert werden. Der Nachweis wurde durch C.O. Schmidt im Rahmen seiner Dissertation erbracht, dem es gelang beide Synthasen zu isolieren.²⁶ Mit Hilfe verschiedener deuteriummarkierter Farnesyldiphosphate konnte der Reaktionsmechanismus auf der Substratseite aufgeklärt werden. Beide Enzyme

bilden zunächst dasselbe cyclische Zwischenprodukt, das (*R*)-Germacradienylkation. In der Biosynthese des (–)-Germacren D findet dann eine 1,3-Hydridverschiebung von der C-6 Position auf die C-11 Position statt. Die Konfiguration des (*R*)-Germacradienylkations an C-7 bleibt dabei erhalten. Die Synthese des (+)-Germacren D verläuft dagegen über zwei 1,2-Hydridverschiebungen, erst von C-7 nach C-11, dann von C-6 nach C-7. Durch diese sequentiellen Umlagerungsschritte findet eine Inversion der Konfiguration an C-7 statt.

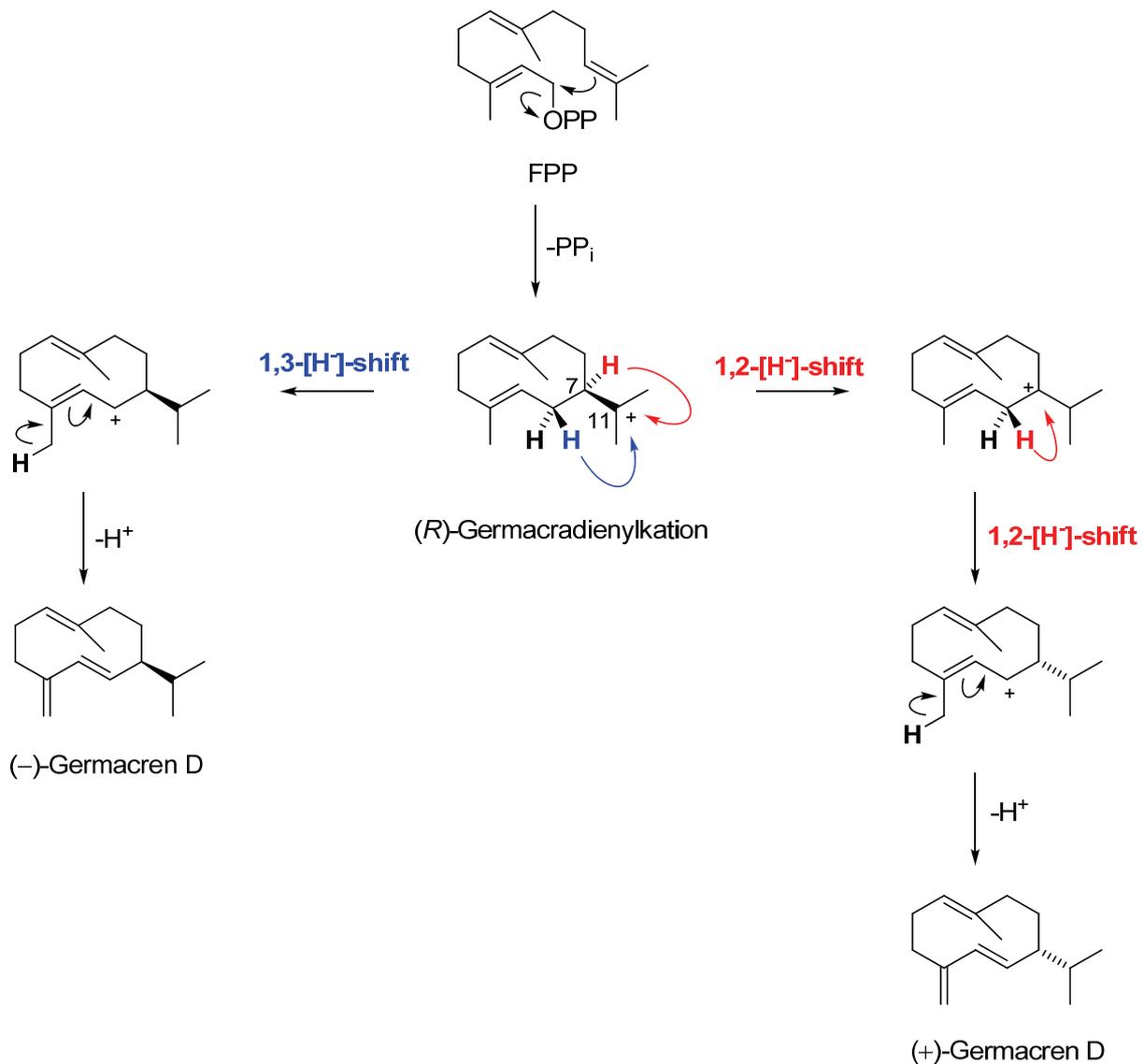


Abbildung 7: Mechanismus der durch die Germacren D Synthasen katalysierten Reaktionen. Beide Enzyme bilden zunächst dasselbe cyclische Zwischenprodukt, das (*R*)-Germacradienylkation. In der Biosynthese des (–)-Germacren D findet anschließend eine 1,3-Hydridverschiebung statt, wobei die Konfiguration des (*R*)-Germacradienylkations an C-7 erhalten bleibt. Die Synthese des (+)-Germacren D verläuft dagegen über zwei 1,2-Hydridverschiebungen unter Inversion der Konfiguration an C-7.²⁶

Im Rahmen ihrer Dissertation gelang es Dr. Iris Fransson (geb. Altug) die cDNA beider Enzyme zu isolieren, in *Escherichia coli* funktionell zu exprimieren und zu charakterisieren.²⁷ Die Sequenz der (+)-Germacren D Synthase umfasst 551 Aminosäuren. Das Molekulargewicht beträgt etwa 65 kDa und das pH-Optimum liegt bei 7.6. Zur Bestimmung der kinetischen Parameter des Enzyms wurde ein radiochemisches Aktivitätsassay mit tritiummarkiertem Farnesyldiphosphat durchgeführt, ein Standardverfahren für Aktivitätsmessungen an Terpensynthasen.^{28;29} Unter den Bedingungen des Assays ergab sich eine Michaelis-Menten-Konstante K_M von 3 μM und ein k_{cat} von 0.02 s^{-1} .³⁰ Das Enzym besitzt zwei ungewöhnliche Mutationen, die beide die metallbindenden Peptidsequenzen betreffen. Das DDXXD/E-Motiv hat die Sequenz ³⁰³NDTYD³⁰⁷, also den Austausch D303N eines der Aspartatreste, das an der Koordination der bivalenten Kationen direkt beteiligt ist. Diese Mutation wurde erstmalig für eine funktionell charakterisierte Terpensynthase beschrieben. Die zweite Mutation betrifft das NSE/DTE-Motiv mit der Sequenz ⁴⁴⁶ILNDIVGHKEE⁴⁵⁶. Mit der natürlichen Mutation S452G ist hier ebenfalls eine direkt an der Metallkoordination beteiligte Aminosäure verändert. Es lässt sich darüber mutmaßen inwiefern sich diese Mutationen auf die Bindung der Metallionen auswirken. Insbesondere der Austausch D303N einer negativ geladenen gegen eine neutrale Aminosäure lässt vermuten, dass bei der (+)-GDS nur ein binuclearer Metallcluster an der Reaktion beteiligt ist.

Die Sequenzen beider Germacren D Synthasen aus *S. canadensis* besitzen 85% Identität und 89% Homologie. Die Mutation des NSE/DTE-Motivs findet sich auch in der Sequenz der (–)-Germacren D Synthase, allerdings fehlt die Mutation an der Position 303. An beiden Enzymen durchgeführte Punktmutationen zeigten, dass der Austausch N303D für die (+)-GDS und D303N für die (–)-GDS keinen Einfluss auf die Produktspezifität hat. Während sich der Austausch bei der (+)-GDS nicht auf die Aktivität auswirkte, verringerte sich die Aktivität der (–)-GDS um den Faktor 10. Die Mutation D/N303E führte bei beiden Enzymen zu einem nahezu vollständigen Aktivitätsverlust.

Zu den Sequenzen von Sesquiterpensynthasen anderer nicht artverwandter Pflanzen besitzt die (+)-Germacren D Synthase etwa eine 40-60%ige Homologie, was auch für andere Sesquiterpensynthasen phylogenetischen Ursprungs gefunden wurde. Zu der 5-*epi*-Aristolochin Synthase, die einzige Sesquiterpensynthase pflanzlicher Herkunft für die Strukturdaten vorliegen, liegt die Homologie bei 38%.³⁰

1.5 Protein-Prenyltransferasen

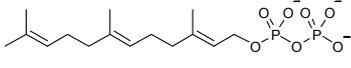
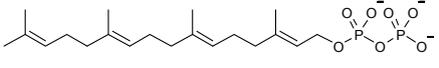
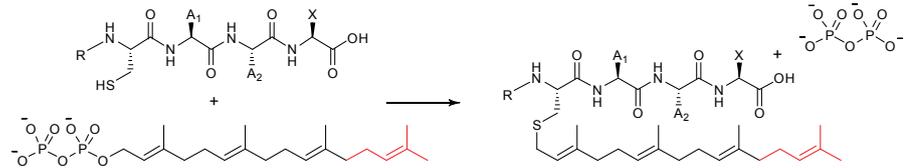
Die Gruppe der Protein-Prenyltransferasen umfasst drei Proteine, die Farnesyltransferase (FTase) die Geranylgeranyltransferase I (GGTase-I) und Rab-Geranylgeranyltransferase (RabGGTase oder GGTase-II). Der Zusatz „Protein“ in dem Namen soll sie von den Prenyltransferasen unterscheiden, die für die Biosynthese der Isoprenoiddiphosphate verantwortlich sind. FTase und GGTase-I katalysieren die Übertragung einer C₁₅- (FDP) bzw. C₂₀-Prenyleinheit (GGDP) auf Cysteinreste von Proteinen, die ein terminales CAAX-Motiv enthalten (C = Cystein, A = eine aliphatische AS, X = eine beliebige AS, die zur Substratspezifität beiträgt). Die Prenylierung dient der Verankerung der Zielproteine in der Membran (Lipidanker). Die *targets* dieser posttranslationalen Modifikation sind Proteine der Superfamilie der kleinen G-Proteine (Ras, Rho, Rap, Rac), die γ -Untereinheit vieler heterotrimerer G-Proteine, Centromeren-Proteine (CNAP-E und CNAP-F) und Andere. Die meisten dieser Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion für Zellproliferation und Apoptose. Im Gegensatz zu FTase und GGTase-I überträgt RabGGTase zwei Geranylgeranylreste und diese ausschließlich auf Proteine der Rab-Familie.^{14;31}

Die Protein-Prenyltransferasen sind für eukariotische Zellen essentiell. Sie wurden in vielen Organismen nachgewiesen, darunter Säugetiere, Pilze, Pflanzen und Protisten. Eine Eliminierung dieser Proteine führt zu schweren Zellschädigungen oder zum Zelltod. Eine Liste mit bekannten und hypothetisch prenylierten CAAX Substraten des humanen Genoms umfasst 120 Proteine. Für über 50 der Proteine liegen signifikante Hinweise auf eine Prenylierung vor. Etwa die Hälfte der 120 Proteine sind Substrate der FTase, die andere der GGTase-I.³²

Tabelle 2 fasst einige der Eigenschaften und Unterschiede der FTase und der GGTase-I zusammen. Beide Enzyme besitzen eine identische α -Untereinheit von 48 kDa und unterscheiden sich in der β -Untereinheit. Die α -Untereinheit ist sichelförmig um die *alpha/alpha barrel* förmige β -Untereinheit assoziiert und hält diese durch sieben aufeinander folgende helicale *hairpin* Paare. Für die Bindung der Peptid-(Protein-)Komponente sowie für die Aktivierung der Thiofunktion des Cysteins und die Übertragung der Prenylgruppe ist Zn²⁺ als Cofaktor essentiell. Das Zinkion wird durch einen Cystein-, Histidin- und Aspartatrest der jeweiligen β -Untereinheit koordiniert.³³ Bei der FTase hängt die Geschwindigkeit der Farnesylierungsreaktion zusätzlich von der Anwesenheit von Magnesium ab. Konzentrationen im millimolaren Bereich erhöhen die Umsatzrate um das

700fache.^{34;35} Die Rolle, die das Magnesium bei der Farnesylierung spielt, konnte bislang nicht genau aufgeklärt werden und gibt Anlass zu wissenschaftlichen Diskussionen.³⁶⁻³⁹ Eine Komplexierung der Diphosphatgruppe, wie bei den Terpensynthasen und anderen Prenyltransferasen, liegt nahe. Die Diphosphatgruppe wird allerdings durch ein Netzwerk von Wasserstoffbrücken zwischen Sauerstoffatomen der Diphosphatgruppe und Protonen überwiegend positiv geladener Aminosäuren (K164 α , R291 β , K294 β und Y300 β) stabilisiert. In diesem Bereich finden sich keine potentiell komplexbildenden Aminosäuren für das Magnesiumion. Dieses gelangt daher vermutlich an das FDP gebunden in das Epitop.³⁸

Tabelle 2: Übersicht über die Eigenschaften und Unterschiede der beiden wichtigen Protein-Prenyltransferasen FTase und GGTase-I. Die CAAX-Box stellt das C-terminale Proteinerkennungsmotiv dar (C = Cystein, A = eine aliphatische AS, X = eine beliebige AS, die zur Substratspezifität beiträgt).³¹

| | Farnesyltransferase (FTase) | Geranylgeranyltransferase I (GGTase-I) |
|---|--|--|
| Lipid-Komponente (Substrat) | Farnesyldiphosphat (FDP)  | Geranylgeranyldiphosphat (GGDP)  |
| Protein-Erkennungsmotiv | CAAX X = Ala, Gln, Ser, Met, Phe | CAAX X = Leu, Phe, selten Met |
| Ausgewählte Proteinsubstrate | Ras, Lamine, γ -Untereinheit von Transducin, Rhodopsin Kinase, Centromeren-Proteine | Rho, Rap, Rac, γ -Untereinheiten von heterotrimeren G-Proteinen |
| Zusammensetzung der Untereinheiten (Säugetiere) | 48 kDa (α) 46 kDa (β) | <i>identisch</i> <i>25% Identität</i> 48 kDa (α) 43 kDa (β) |
| Cofaktoren | Zn ²⁺ , Mg ²⁺ | Zn ²⁺ <i>Zn²⁺ ist essentiell für die Reaktion und die Bindung der Proteinkomponente</i> |
| Die katalysierte Reaktion |  | |

Bei der GGTase-I erfolgt die Komplexierung der Diphosphatgruppe des GGDP ausschließlich durch positiv geladene Aminosäuren, die Magnesiumkonzentration besitzt keinen Einfluss auf die Umsatzrate.³¹ Die Spezifität der FTase und GGTase-I für ein bestimmtes *target* liegt auf der Seite des Proteinsubstrats. Hier bestimmt die terminale Aminosäure des CAAX-Motivs durch welches Enzym die Prenylierung vorgenommen wird. Alanin, Glutamin und Serin werden spezifisch durch die FTase erkannt, Leucin durch die GGTase-I. Phenylalanin wird von beiden Enzymen akzeptiert, Methionin normalerweise durch die FTase, in einigen Fällen aber auch durch die GGTase-I.^{32;40;41}

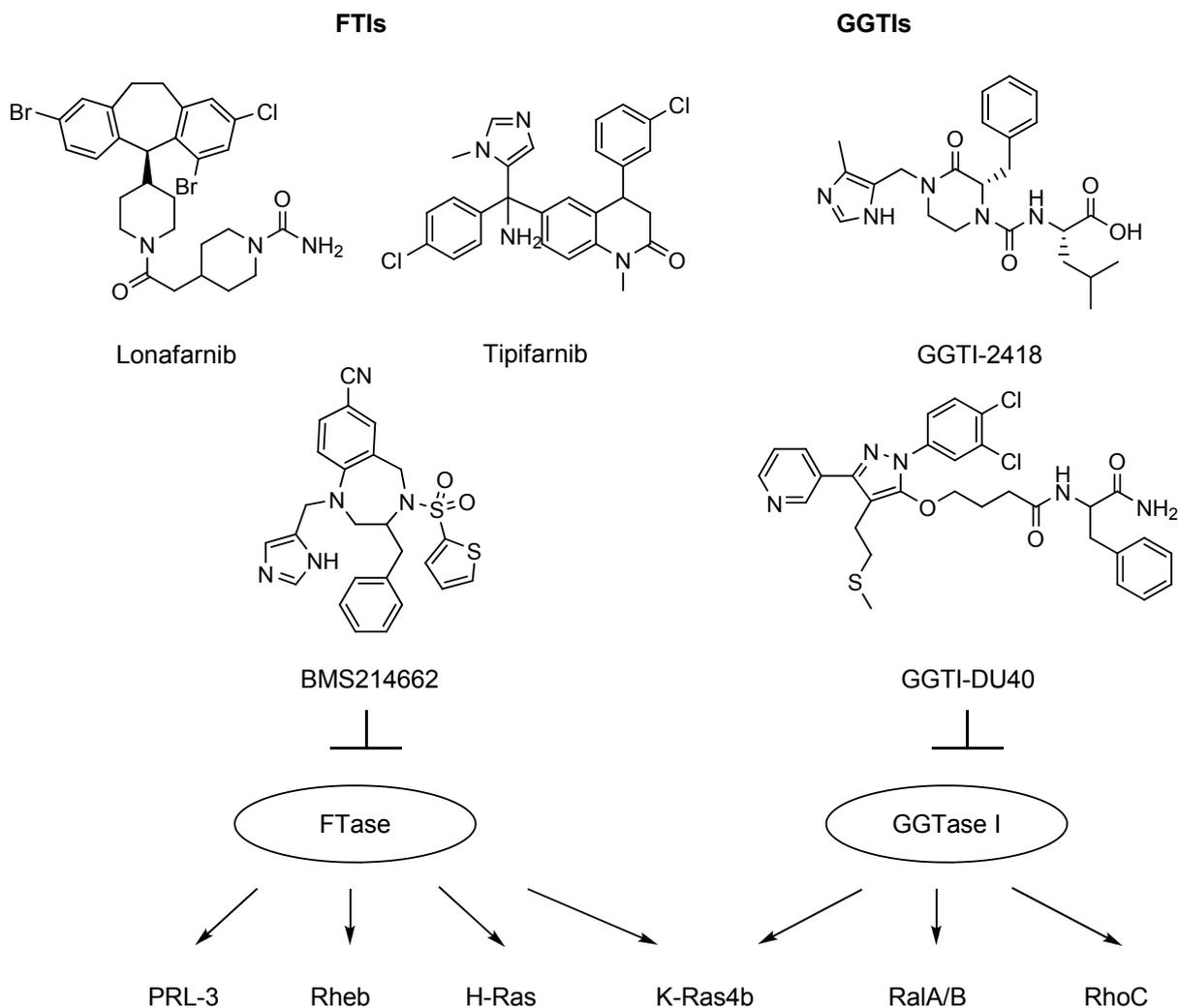


Abbildung 8: Einige Beispiele von Inhibitoren der FTase und der GGTase-I (FTIs und GGTIs) als potentielle Zytostatika. Die drei gezeigten FTIs befinden sich aktuell in klinischen Studien der Phasen I-III.⁴²

Defekte, die bei den Zielproteinen der Protein-Prenyltransferasen auftreten, werden mit einer Reihe von Krankheiten in Verbindung gebracht. Dazu zählen insbesondere verschiedene Arten von Krebs. Die am intensivsten untersuchte Klasse der CAAX-Proteine sind die

Mitglieder der Ras-Familie (K-Ras, H-Ras und N-Ras). Sie werden durch die FTase modifiziert. Mutierte Formen von mindestens einem Vertreter findet man bei ca. 20-30% aller Tumore. Die Mutationen führen zu einem Verlust ihrer GTPase-Aktivität, die den G-Proteinen als Inaktivierungsmechanismus dient. Dadurch befindet sich die mutierte Form dauerhaft im aktivierten Zustand und sendet kontinuierlich ein Signal an den Zellkern. Als Folge wird unkontrolliertes Zellwachstum ausgelöst. Da die Prenylierung und die damit verbundene Lokalisierung der kleinen G-Proteine in der Zellmembran eine Voraussetzung für die Signaltransduktion ist, können Ras-Proteine durch Inhibitoren der FTase indirekt deaktiviert werden.^{14;43-45} Inzwischen befinden sich einige Farnesyltransferase-Inhibitoren (FTIs) in klinischen Studien der Phasen I-III. Viel versprechende Beispiele sind Tipifarnib und Lonafarnib. Leider zeigen sich beim Menschen, im Gegensatz zu Versuchen am Tiermodell, deutliche Unterschiede in der Wirksamkeit. Obwohl für die FTIs eine Inhibition des Tumorwachstums nachgewiesen werden konnte, scheinen diese Substanzen nicht an der gewünschten Stelle zu wirken. Die Wirksamkeit von Tipifarnib bei einigen Leukämie-Varianten korreliert nicht mit dem Auftreten von mutierten Ras-Proteinen. Zudem fällt die Wirksamkeit deutlich geringer aus als erwartet. K-Ras4B, eine Ras-Variante die häufig von Mutationen betroffen ist, kann alternativ durch die GGTase-I prenyliert werden. Ein Grund für die Inhibition des Tumorwachstums bei Abwesenheit maligner Ras-Formen lässt sich möglicherweise auf die Inhibition der Prenylierung anderer Proteine zurückführen. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Notwendigkeit weiterer Studien.^{42;46;47}

1.6 STD-NMR-Experimente an Enzymsystemen

Die *saturation transfer difference* (STD) NMR-Spektroskopie ist eine Methode, um die Bindungseigenschaften eines niedermolekularen Liganden an ein Protein zu untersuchen. Erstmals wurde das Verfahren von Mayer und Meyer 1999 für das *screening* von Substanzbibliotheken eingesetzt.⁴⁸⁻⁵⁰ Außerdem ermöglicht das STD-NMR-Experiment Aussagen zur Bindungsaktivität (Dissoziationskonstante, K_D) und eröffnet einen Einblick in die molekularen Details der Bindung auf Seite des Liganden (Bindungsepitop).⁵¹ Seit ihrer Einführung hat sich die Methode durch ihre hohe Anwendungsbreite schnell weiterentwickelt.

Die Methode basiert auf einem Sättigungstransfer, der vom Protein auf den Liganden übertragen wird. Nach der Dissoziation vom Protein wird die Sättigung in der Lösung am freien Liganden detektiert (Eine ausführliche Beschreibung der Methode folgt in Abschnitt 2.1.1, S. 21). Die Vorteile, die sich aus dieser Messtechnik ergeben, liegen hauptsächlich in

der ligandbasierten Detektion begründet. Für das STD-NMR-Experiment ist keine Isotopenmarkierung des Proteins erforderlich und es werden nur geringe Proteinmengen benötigt ($> 0.1 \mu\text{M}$). Bezüglich des Molekulargewichtes gibt es auf der Seite des Proteins keine Obergrenze. Meistens sind für die Charakterisierung der Bindungseigenschaften 1D ^1H -NMR basierte Pulssequenzen ausreichend. Bei hoher Signalüberlagerung auf der Ligandseite lässt sich die STD-Methode aber auch auf andere NMR-Pulsprogramme wie z.B. TOCSY oder HSQC anwenden.⁵²

Für die Entwicklung von Inhibitoren enzymkatalysierter Reaktionen sind in der Regel nicht nur Informationen über die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren notwendig, sondern auch Details über den Bindungsmodus der Substrate und/oder Produkte. Standardmäßig werden enzymkatalysierte Reaktionen in Assays nach der Kinetik von Michaelis-Menten charakterisiert, um so Hinweise auf den Mechanismus und die katalytische Effizienz zu erhalten. Strukturdaten von Enzymen können mittels Röntgenstrukturanalyse oder durch mehrdimensionale NMR-Experimente gewonnen werden. Um Strukturdaten von Enzym-Substrat-Komplexen zu erhalten muss häufig ein hoher Aufwand betrieben werden, um einen Umsatz der Substrate zu verhindern. Bei Mehrsubstrat-Enzym-Systemen können mehrere Ansätze mit den jeweiligen Teilsubstraten die erforderlichen Daten liefern. Bei Einsubstrat-Enzym-Systemen verkompliziert sich der Sachverhalt zusätzlich. Liegt kein Inhibitor für das zu untersuchende Enzym-Substrat-System vor, wird es schwierig Strukturdaten über die Bindung zu erhalten. Es gelingt in einigen Fällen Kristalle für die Röntgenstrukturanalyse nachträglich mit dem Substrat zu behandeln, so dass das Substrat in das aktive Zentrum diffundiert und von dem kristallisierten Enzym nicht oder nur extrem langsam umgesetzt wird. Allerdings kann ein solches Vorgehen zu artifiziellen Bindungen führen, da kein Umsatz stattfindet und es kann schwierig sein eine solche Bindung von der bioaktiven zu unterscheiden.

Viele der gängigen Affinitätsassays, die auf biochemischen Methoden beruhen, erfordern einen Liganden, der kovalent mit einem Protein/Peptid bzw. einer Fluoreszenzmarkierung verknüpft ist, oder eine radioaktive Isotopenmarkierung. Eine solche Modifikation kann zeit- und kostenaufwendig sein oder die Messresultate beeinflussen. Andere Methoden, wie z.B. die *surface plasmon resonance* (SPR), erfordern eine Immobilisierung der Protein- oder der Ligandkomponente. NMR-basierte Methoden arbeiten in Lösung und erfordern in der Regel keine modifizierten Liganden oder Proteine. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass mit Hilfe der NMR-Spektroskopie, je nach Messtechnik, neben den bindungsspezifischen Daten

weitere Informationen zugänglich sind, z.B. über Dynamik, Konformation, Orientierung und Bindungsepitop des Liganden. Die Informationen werden dabei mit atomarer Auflösung erhalten und können wertvolle Hinweise für die Entwicklung von Inhibitoren liefern.

Alle Vorteile der STD-Methode, die für die Untersuchung von Rezeptor-Ligand-Systemen gültig sind, gelten generell auch für die Untersuchung von Enzym-Substrat-Systemen. Andererseits gelten bei der Durchführung von STD-Experimenten auch die Limitierungen des Substratumsatzes. Die erste Enzym-Substrat-Wechselwirkung, die mittels STD-NMR-Spektroskopie untersucht wurde, ist die Bindung von Uridindiphosphat-D-galactose an die β -1,4-Galactosyltransferase T1.⁵³ Das Enzym katalysiert die Übertragung der Galactoseeinheit aus dem Nucleotid-aktivierten Donor auf *N*-Acetylglucosamin-Einheiten von Glycoproteinen und Glycosphingolipiden. Die Experimente lieferten erstmalig einen Einblick in den Bindungsmodus von Uridindiphosphat-D-galactose an das Enzym. Da die Versuche in Abwesenheit des Akzeptorsubstrats durchgeführt wurden, spielte der enzymatische Umsatz keine Rolle.

Brecker *et al.* berichteten 2006 von der Charakterisierung der Substratbindung zweier Glycosidhydrolasen mittels STD-NMR-Spektroskopie.⁵⁴ Eines der untersuchten Enzyme, *Clostridium thermocellum* Endoglucanase B (CelB), weist ein Aktivitätsmaximum bei einer Temperatur von > 90 °C auf. Durch eine Spektrenakquisition bei 30 °C war die Reaktionsgeschwindigkeit des Enzyms soweit herabgesetzt, dass der Umsatz nur eine untergeordnete Rolle spielte. Die Bindung verschiedener Substrate konnte hinsichtlich der Epitope untersucht und verglichen werden. Für das zweite Enzym, *Aspergillus fumigatus* BG1 (Af β Gly), wurden Spektren bei 10 °C und bei 30 °C aufgenommen, welche substrat- und produktspezifische STD-Signale je nach Temperatur lieferten. Durch eine geeignete Wahl der experimentellen Parameter lassen sich somit auch Ein-Substrat-Enzyme mittels STD-NMR-Spektroskopie untersuchen.

1.7 Micellen

Amphiphile Moleküle tendieren in wässriger Umgebung zur Selbstorganisation, wobei sich bimolekulare Schichten (Membranen) oder geschlossene Strukturen bilden können. Letztere werden je nach Aufbau in Micellen und Liposomen unterteilt. Die Präferenz zur Ausbildung eines bestimmten Typs hängt von der Struktur des Lipids ab. Während sogenannte *double chain amphiphiles* (z.B. Phosphoglycerolipide, Sphingolipide) Membranen und Liposomen

mit *bilayer*-Struktur ausbilden, führt die Aggregation von *single chain amphiphiles* in der Regel zur Bildung von *monolayer*-Strukturen.⁵⁵

Die spontane Selbstorganisation amphiphiler Moleküle beruht auf dem kooperativen Zusammenspiel hydrophiler und hydrophober Wechselwirkungen. Als charakteristische Größe für micellbildende Verbindungen wird die kritische Micellkonzentration (CMC, *critical micelle concentration*) definiert. Typische Werte liegen zwischen $10^{-2} - 10^{-3}$ M für ionische Amphiphile und zwischen $10^{-3} - 10^{-4}$ M für nicht-ionische. Für Lösungen eines Amphiphils unterhalb der CMC ändern sich konzentrationsabhängig die physikalischen Eigenschaften der Lösung, z.B. der osmotische Druck, die Oberflächenspannung, die elektrische Leitfähigkeit. Bei Erreichen der CMC tritt eine Änderung der Konzentrationsabhängigkeit ein, die sich bei weiter ansteigender Konzentration fortsetzt. Die sprunghafte Änderung der Konzentrationsabhängigkeit lässt sich darauf zurückführen, dass das Amphiphil unterhalb der CMC monomolekular in Lösung geht, oberhalb der CMC assoziiert es zu den micellaren Molekülverbänden (Abbildung 9). Die Konzentration der Monomere bleibt oberhalb der CMC konstant. Dieses Verhalten wird thermodynamisch durch das Phasenseparationsmodell beschrieben, bei der die Micellen als Pseudophase behandelt werden. Die CMC stellt in dem Modell die Sättigungskonzentration an der monomeren Spezies in der Lösung dar.⁵⁶

Um die Konzentrationsabhängigkeit der molekularen Eigenschaften eines Amphiphils in wässriger Lösung zu beschreiben ist das Phasenseparationsmodell ausreichend. Eine bessere Beschreibung liefert allerdings das Gleichgewichtsmodell, bei dem die Micellbildung analog zum chemischen Gleichgewicht behandelt wird. Eine Gleichgewichtskonstante beschreibt das dynamische Gleichgewicht zwischen den Amphiphilen in Lösung und in den Micellen. Die CMC verliert hierbei ihre strikte Bedeutung, da die Bildung der Micellen eher in einem engen Konzentrationsbereich stattfindet. Vom praktischen Standpunkt aus gesehen behält die CMC ihre Bedeutung als Näherung für den Konzentrationsbereich. Die Konzentrationsabhängigkeit der Micellbildung aus Abbildung 9 bleibt für das Gleichgewichtsmodell weitgehend erhalten, nur dass der Übergang von der rein monomeren Lösung zur Micelle nicht so abrupt verläuft. Der Übergangsbereich lässt sich am besten dadurch deuten, dass eine Aggregation der Amphiphilmonomere bereits vor der CMC beginnt.⁵⁶

Hill und andere erweiterten die obigen Konzepte zu einer Thermodynamik der kleinen Systeme, bei der die Bildung von Aggregaten unterschiedlicher Größe und die dynamischen

Gleichgewichte von Aggregaten untereinander berücksichtigt werden. Variablen wie Temperatur, Druck und das chemische Potential der Monomere in wässriger Lösung bestimmen Eigenschaften wie die Verteilungsbreite und den Medianwert der Micellgröße. Der Ansatz führt allerdings zu einer großen Anzahl formaler thermodynamischer Beziehungen, deren Komplexizität von geringem praktischem Nutzen sind. Eine der wichtigen Schlussfolgerungen aus dem Ansatz ist, dass die Micellgröße mit steigender Gesamtkonzentration des Amphiphils ansteigt, was sich auch experimentell belegen lässt. Dabei können neben den typisch sphärischen Micellformen auch weitere stabförmige entstehen. Bei höheren Konzentrationen lagern sich diese zusammen und bilden Mesophasen (nematische Phasen, Flüssigkristalle), deren Zustand zwischen dem von isotropen Flüssigkeiten und dem von festen Kristallen liegt.⁵⁶

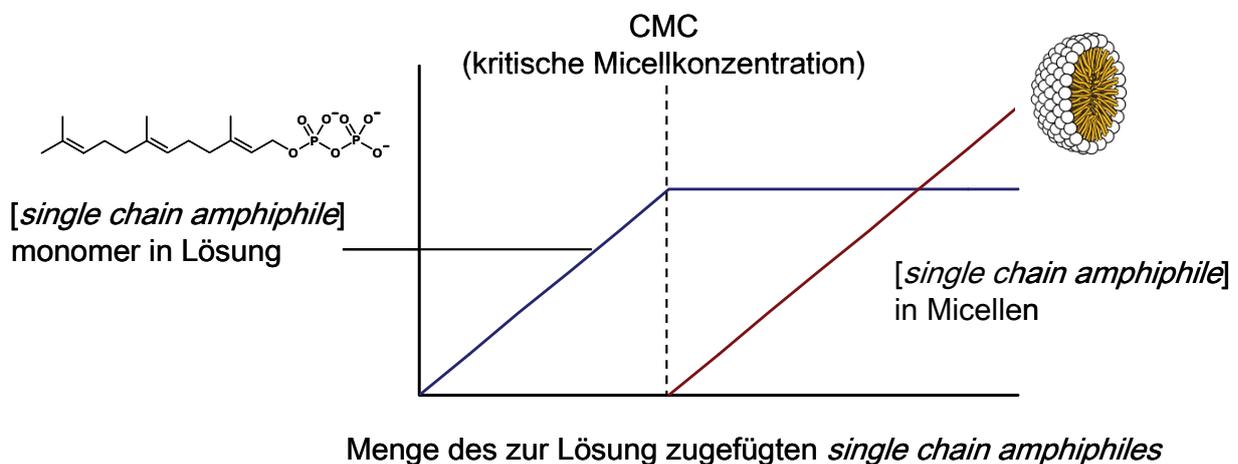


Abbildung 9: Mechanismus der Micellbildung nach dem Phasenseparationsmodell. Die CMC stellt die Sättigungskonzentration an Monomeren eines *single chain amphiphiles* in wässriger Lösung dar. Erhöht man die Konzentration des Amphiphils über die CMC hinaus, assoziieren dessen Monomere zu micellaren Molekülverbänden. Im Phasenseparationsmodell werden die Micellen als Pseudophase behandelt.

Für die Bestimmung der CMC lassen sich generell alle physiko-chemischen Eigenschaften verwenden, die eine Änderung in der Konzentrationsabhängigkeit bei Micellbildung zeigen. Typische Methoden basieren auf Lichtstreuung, Viskositätsmessungen oder potentio- und calorimetrischen Messungen. Besonders die NMR-Spektroskopie hat sich als eine geeignete Methode hervorgetan, mit der micellare Systeme vielfältig untersucht werden können. Nützliche NMR-Parameter sind u.a. die chemische Verschiebung, sowohl von ^1H als auch von ^{13}C , ^{19}F oder ^{31}P -Kernen, T_1 - und T_2 -Relaxationszeiten sowie Diffusionskoeffizienten, die sich mittels *pulsed field gradient* (PFG)-Techniken bestimmen lassen.⁵⁶⁻⁶²

2 METHODEN

2.1 NMR-Spektroskopie

2.1.1 *Saturation Transfer Difference* (STD) NMR-Spektroskopie

Die STD-NMR-Methode ist bereits kurz im Abschnitt 1.6 (S. 16) eingeführt worden. Mit ihr können die Bindungseigenschaften eines niedermolekularen Liganden an ein Protein untersucht werden. Voraussetzung für das STD-Experiment ist ein schneller Austausch des Liganden an der Bindungsstelle des Proteins in Relation zur Sättigungszeit. In diesem Fall lässt sich intermolekular Sättigung vom Protein auf das bindende Molekül übertragen. Bei Dissoziation des Komplexes wird die Sättigung anschließend in Lösung transferiert und dort detektiert. Die Sättigung des Proteins erfolgt durch eine Kaskade von selektiven Gaußpulsen für eine Dauer von einer bis vier Sekunden. Sie ist möglich, da Proteine hohe Linienbreiten aufgrund ihrer kurzen T_2 -Relaxationszeiten besitzen, und somit Einstrahlpunkte für einen Sättigungspuls außerhalb der spektralen Breite des Liganden gefunden werden können. Als Einstrahlpunkt werden typischerweise Resonanzen im Bereich von 0 bis -1 ppm gewählt, aber auch Resonanzen im aromatischen Bereich sind bei geeigneten Liganden möglich. Durch die Spindiffusion, einem indirekten Magnetisierungstransfer zwischen zwei Kernen über einen dritten, überträgt sich die Sättigung auf das gesamte Protein. Dieser Effekt tritt auf, wenn die Kreuzrelaxationsrate groß gegenüber der T_1 -Relaxationszeit ist, was ab einer Molekülgröße von ca. 10 kDa der Fall ist. Für Proteine mit kleineren Molekulargewichten eignet sich die STD-NMR-Spektroskopie deshalb nicht. Da die Spindiffusion mit steigendem Molekulargewicht immer effektiver wird, gibt es keine Obergrenze bezüglich der Proteingröße.⁵²

Das eigentliche STD-Experiment besteht in der Aufnahme von zwei Teilspektren, einem *on-resonance* und einem *off-resonance* Spektrum (Abbildung 10). Im *on-resonance* Spektrum erfolgt die selektive Sättigung des Proteins. Aufgrund der Übertragung der Sättigung auf den Liganden sind dessen Signalintensitäten abgeschwächt. Im *off-resonance* Spektrum erfolgt eine Einstrahlung der Sättigungs-Puls-Kaskade *off-resonance* aller Signalintensitäten, z.B. bei 40 ppm. Dieses Spektrum entspricht einem normalen ^1H -NMR-Spektrum. Die Einstrahlung des *off-resonance* Pulses ist wichtig, um Differenzartefakte durch Temperaturschwankungen in der Probe oder der Geräteelektronik zu vermeiden. Aus der Differenz von *off-* und *on-resonance* Spektrum ergibt sich das STD-Spektrum mit Signalintensitäten nur für bindende

Moleküle. Im Gegensatz zu früheren STD-Pulsprogrammen, bei denen die *on-* und *off-resonance* Spektren intern über einen Phasenzyklus abgezogen wurden, lassen sich mit einer moderneren Pseudo-2D-Variante beide Spektren getrennt aufzeichnen.⁶³ Dadurch kann das *off-resonance* Spektrum direkt als Referenzspektrum verwendet werden. Die Intensität der Signale hängt mit der $1/r^6$ -Abhängigkeit der Kreuzrelaxationsrate vom Bindungsabstand der entsprechenden Protonen von Ligand und Protein ab.⁶⁴ Hieraus eröffnet sich die Möglichkeit eines *group epitope mappings*. Zur Unterdrückung störender Proteinsignale wird ein $T_{1\rho}$ -Filter verwendet. Das HDO-Signal deuterierter Puffer kann mit Hilfe von Standard-Pulssequenzen unterdrückt werden (WATERGATE, *excitation sculpting*).^{65;66}

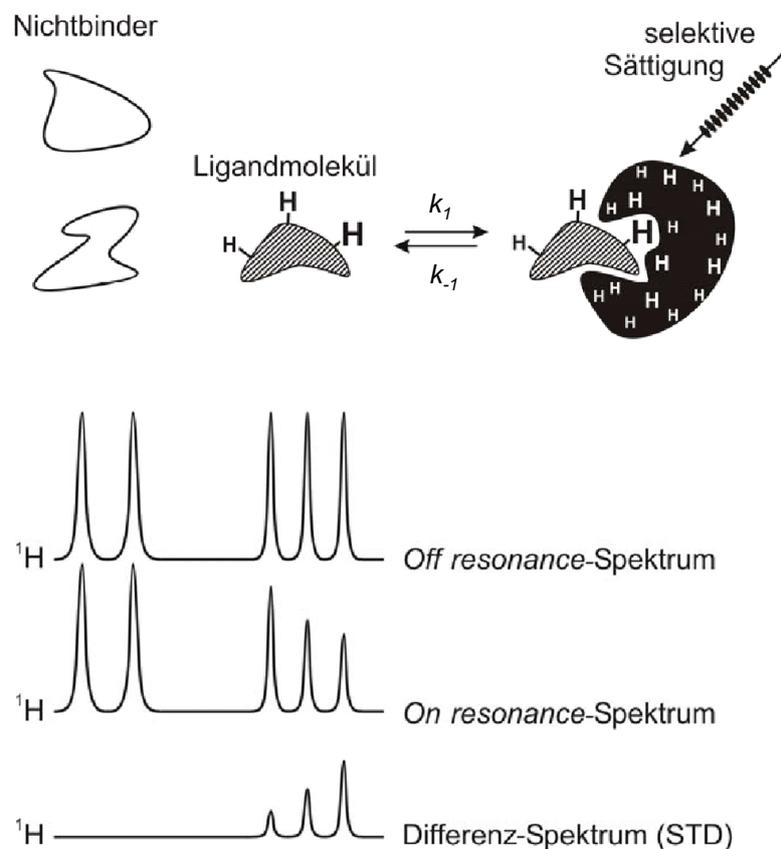
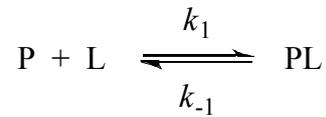


Abbildung 10: Schematische Darstellung des Prinzips eines STD-Experiments. Im *on-resonance*-Spektrum wird ein zu untersuchendes Protein-*target* selektiv gesättigt. Die Sättigung überträgt sich durch den Effekt der Spindiffusion auf das gesamte Protein und auf einen bindenden Liganden. Nach der Dissoziation wird die Sättigung vom Liganden in Lösung nur langsam abgebaut und kann dort durch eine Intensitätsabnahme der Protonenresonanzen detektiert werden. Die Stärke der Intensitätsabnahme hängt von der Nähe der Ligandprotonen zu Protonen in der Bindungstasche des Proteins ab und ermöglicht ein *epitope mapping*. Nichtbindende Moleküle erfahren keinen Sättigungstransfer und somit auch keine Abnahme der Signalintensitäten. Durch Aufnahme eines Referenzspektrums (*off-resonance*-Spektrum) und Differenzbildung wird das STD-Spektrum erhalten, das nur Signale bindender Moleküle enthält. Die Methode eignet sich für das *screening* von Substanzbibliotheken.

Neben den intermolekularen Kernabständen ist die Bindungskinetik für die Intensität der STD-Signale entscheidend. Für das Dissoziationsgleichgewicht gilt:



$$K_D = \frac{[P][L]}{[PL]} = \frac{k_{-1}}{k_1}$$

Gleichung 1: Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D ; [P] = Konzentration des Proteins; [L] = Ligandkonzentration; [PL] = Konzentration des Protein-Ligand-Komplexes; k_1 = Assoziationsrate; k_{-1} = Dissoziationsrate.

Ist die Dissoziationsrate klein gegenüber der Sättigungszeit, dann ist der Durchsatz an Ligandmolekülen, die die Bindungstasche erreichen, gering. Ist die Dissoziationsrate dagegen sehr groß, findet während der Residenzzeit in der Bindungstasche kein ausreichender Sättigungstransfer statt. Für STD-Messungen sollte k_{-1} mindestens in der Größenordnung um 0.01 s^{-1} liegen.

Für die Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D müssen Titrationskurven aufgezeichnet werden. Dabei wird für verschiedene Ligandkonzentrationen der STD-Effekt durch Vergleich mit dem *off-resonance* Spektrum bestimmt und der STD-Amplifikationsfaktor nach Gleichung 2 berechnet. Der STD-Amplifikationsfaktor dient der Quantifizierung des Durchsatzes an Ligandmolekülen und berücksichtigt, neben den absoluten STD-Intensitäten, die Ligandüberschüsse.

$$STD_{Ampl.} = \frac{I_0 - I_{sat}}{I_0} \times \frac{[L]_0}{[P]_0}$$

Gleichung 2: Berechnung des STD-Amplifikationsfaktors $STD_{Ampl.}$; I_0 = Signalintensität im *off-resonance* Spektrum; I_{sat} = Signalintensität im *on-resonance* Spektrum; $[L]_0$ = Gesamtligandkonzentration; $[P]_0$ = Gesamtproteinkonzentration.

Durch Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren gegen die Ligandkonzentration erhält man im Falle einer spezifischen Bindung eine Sättigungskurve. Lässt sich das *one-site binding Modell* anwenden, ergibt sich der K_D nach *fit* an die Gleichung 3:

$$STD_{Ampl.} = \frac{STD_{Ampl.(max)}[L]}{K_D + [L]}$$

Gleichung 3: Auswertung einer Titrationsreihe nach dem *one-site binding Modell*. $STD_{Ampl.(max)}$ = Sättigungswert der Bindungskurve; K_D = Dissoziationskonstante; $[L]$ = Ligandkonzentration.

Bei einer Bestimmung der relativen Größe der STD-Intensitäten innerhalb des Liganden muss der Sättigungsaufbau und -abbau berücksichtigt werden. Protonen mit langen T_1 -Relaxationszeiten bauen die Sättigung nur langsam ab und es werden zu kurze intermolekulare Bindungsabstände vorgetäuscht. Ist die T_2 -Relaxationszeit des gebundenen Liganden im Verhältnis zur Verweildauer in der Bindungstasche sehr klein, dann verteilt sich die Sättigung möglicherweise zu schnell über das Molekül und die STD-Signale gleichen sich einander an. In beiden Fällen würde das Epitop falsche Bindungsabstände wiedergeben. Das Gleichgewicht von Sättigungsfluss und Relaxation wird durch Gleichung 4 repräsentiert, die durch einen rekursiven Ansatz erhalten werden kann.⁶⁷ Sie beschreibt die Abhängigkeit des STD-Effektes von den kinetischen Größen der Bindungsreaktion und den Relaxationsparametern.

$$\frac{[L]_{sat}}{[L]_0} = 1 - \frac{-\left[\frac{[PL]Sat + [L]_0 Rel}{[L]_0}\right]^{\frac{t_{sat}k_{-1}}{\ln 2}} [PL]Sat + [L]_0 (Rel - 1)}{-[PL]Sat + [L]_0 (Rel - 1)}$$

mit $[PL]$, Sat und Rel, die durch die folgenden Zusammenhänge beschrieben sind:

$$[PL] = \frac{1}{2} \left(K_D + [P]_0 + [L]_0 - \sqrt{K_D^2 + 2K_D[P]_0 + 2K_D[L]_0 + [L]_0^2 - 2[P]_0[L]_0 + [P]_0^2} \right)$$

$$Sat = 1 - \exp\left(-\frac{R_{sat} \ln 2}{k_{-1}}\right)$$

$$Rel = \exp\left(-\frac{R_1 \ln 2}{k_{-1}}\right)$$

Gleichung 4: Gleichung zur Beschreibung der Abhängigkeit des STD-Effektes $[L]_{sat}/[L]_0$ von den kinetischen Größen der Bindungsreaktion und den NMR-Relaxationsparametern. $[L]_{sat}$: Anteil gesättigter Ligandmoleküle; $[L]_0$: Ausgangskonzentration des Liganden; $[P]_0$: Ausgangskonzentration des Proteins; t_{sat} : Sättigungszeit; Sat: Term für den Sättigungsfluss; Rel: Term für die Relaxation; R_{sat} : Sättigungsrate; R_1 : longitudinale Relaxationsrate.

Das STD-Verfahren lässt sich nicht nur auf lösliche Protein-Ligand-Systeme anwenden. Unter anderem gelang eine Anwendung der STD-Technik auch für immobilisierte Proteine mittels HRMAS-STD-Spektroskopie sowie für in Liposomen eingebettete membranständige Rezeptorproteine.^{68;69} Durch Anwendung einer neuen *double difference* Methode war die Untersuchung von Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen an intakten Zellen möglich.⁷⁰

2.1.2 T_1 -Relaxationsmessungen

Unter Relaxation versteht man allgemein die Rückkehr eines Systems in den Grundzustand, dass durch eine Störung aus dem Gleichgewicht gebracht wurde. In der NMR-Spektroskopie unterscheidet man zwei Arten, die longitudinale und die transversale Relaxation. Nach einem 90° -Impuls rotiert der Magnetisierungsvektor um die z-Achse in die xy-Ebene. Die longitudinale bzw. T_1 -Relaxation beschreibt, wie schnell sich die Gleichgewichtsmagnetisierung wieder einstellt, der Magnetisierungsvektor also auf die z-Achse zurückkehrt. Da es sich in diesem Fall um eine Übertragung der Energie vom Spinsystem auf die Umgebung handelt, wurde ursprünglich auch der Name Spin-Gitter-Relaxation verwendet. Die transversale bzw. T_2 -Relaxation dagegen beschreibt, wie schnell die durch den 90° -Puls in der xy-Ebene erzeugte Phasenkohärenz wieder verloren geht. Sie ist vor allem von den Spin-Spin-Wechselwirkungen abhängig, die ein Auffächern der Phasenkohärenz bewirken. Das Auffächern kommt dadurch zustande, dass die einzelnen magnetische Dipole, die zu der Gesamtmagnetisierung beitragen, mit leicht unterschiedlichen Frequenzen präzedieren. Da über die transversale Relaxation keine z-Magnetisierung wieder hergestellt wird, kann T_2 maximal so lang sein wie T_1 .⁷¹

Die Größe beider Relaxationszeiten hängt von der Resonanzfrequenz ω_0 und der Korrelationszeit τ_c ab, die als ein Maß für die Beweglichkeit eines Moleküls gedeutet werden kann (Abbildung 11). Kleine Moleküle besitzen lange T_1 -Relaxationszeiten, aufgrund ihrer schnellen Umorientierung spielen Spin-Spin-Relaxationsmechanismen kaum eine Rolle. Die kürzesten T_1 -Relaxationszeiten findet man für Moleküle mit $\omega_0\tau_c = 1$, d.h. der Energieaustausch mit der Umgebung verläuft am effektivsten. Für große Moleküle oder Molekülverbände, wie Proteine oder Micellen, oder auch kleine Moleküle in viskosen Flüssigkeiten werden die T_1 -Relaxationszeiten wieder länger. Aufgrund der hohen Korrelationszeiten spielen Spin-Spin-Wechselwirkungen eine wichtige Rolle, woraus kurze T_2 -Relaxationszeiten resultieren.⁷¹

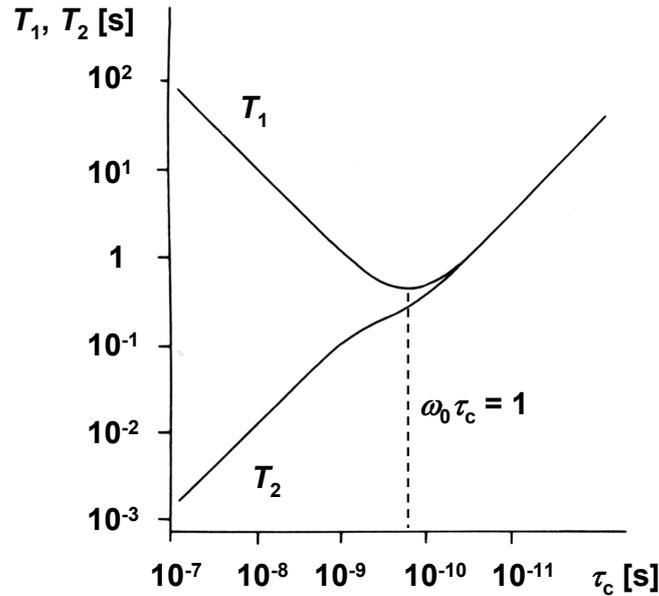


Abbildung 11: Logarithmische Darstellung für die Abhängigkeit der T_1 - und T_2 -Relaxationszeit von der Korrelationszeit τ_c . Moleküle mit kurzen Korrelationszeiten relaxieren langsam. Die T_1 -Relaxationszeit durchläuft bei $\omega_0 \tau_c = 1$ ein Minimum und steigt dann wieder an. Die T_2 -Relaxationszeit ist näherungsweise umgekehrt proportional zu τ_c .

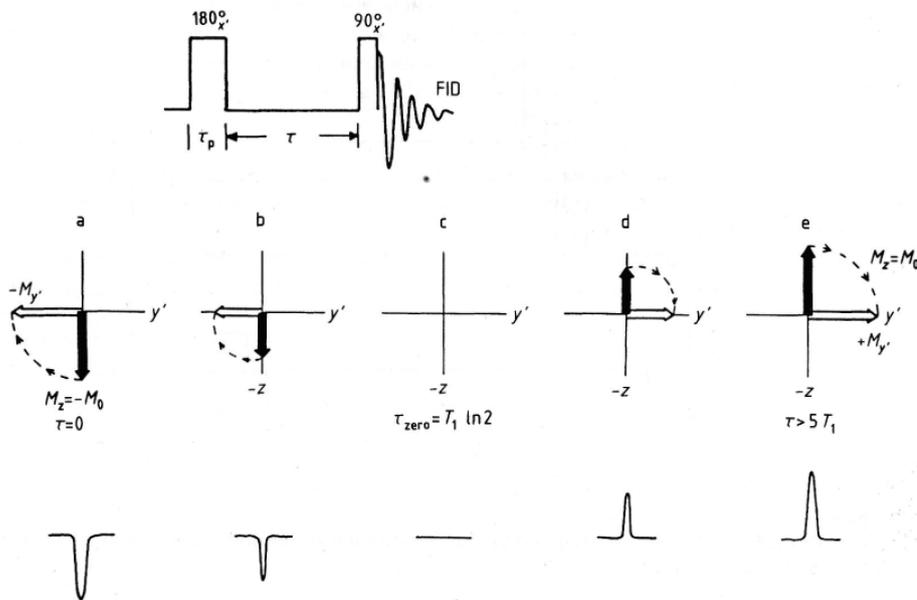


Abbildung 12: Prinzip des T_1 inversion recovery Experiments. Auf einen 180° Inversionspuls folgt ein Relaxationsdelay τ , an den sich ein 90° -Auslesepuls anschließt. Für $\tau = 0$ erhält man ein Spektrum mit voller Signalintensität aber negativer Amplitude. Mit zunehmender Zeit des delays relaxiert der Magnetisierungsvektor fortschreitend, bis für $\tau > 5T_1$ ein Spektrum mit voller Signalintensität und positiver Amplitude aufgezeichnet wird. Durch die Aufzeichnung einer Serie von Spektren lässt sich der Nulldurchgang bestimmen, aus dem T_1 nach Gleichung 5 berechnet werden kann.⁷²

Die übliche Methode zur Bestimmung von longitudinalen Relaxationszeiten ist das *inversion recovery* Experiment (Abbildung 12). Die Pulssequenz sieht zunächst einen 180°-Puls vor, der die z-Magnetisierung invertiert. Nach einer gewissen Zeit, dem Relaxationsdelay τ , folgt ein 90°-Auslesepuls. Durch die Aufnahme einer Serie von Spektren mit variablen τ zwischen 0 und $5T_1$ sowie Auftragung der Signalintensitäten gegen τ , kann durch *fit* an Gleichung 5 die Zeitkonstante T_1 ermittelt werden.⁷¹

$$I(\tau) = I_0(1 - 2e^{-\tau/T_1})$$

Gleichung 5: Funktion zur Bestimmung von T_1 ; $I(\tau)$ = Signalintensität zum Zeitpunkt τ , τ = Relaxationsdelay. Der Faktor 2 des Exponentialterms folgt, da dass *inversion recovery* Experiment mit invertierter z-Magnetisierung beginnt.

2.2 Surface Plasmon Resonance (SPR)

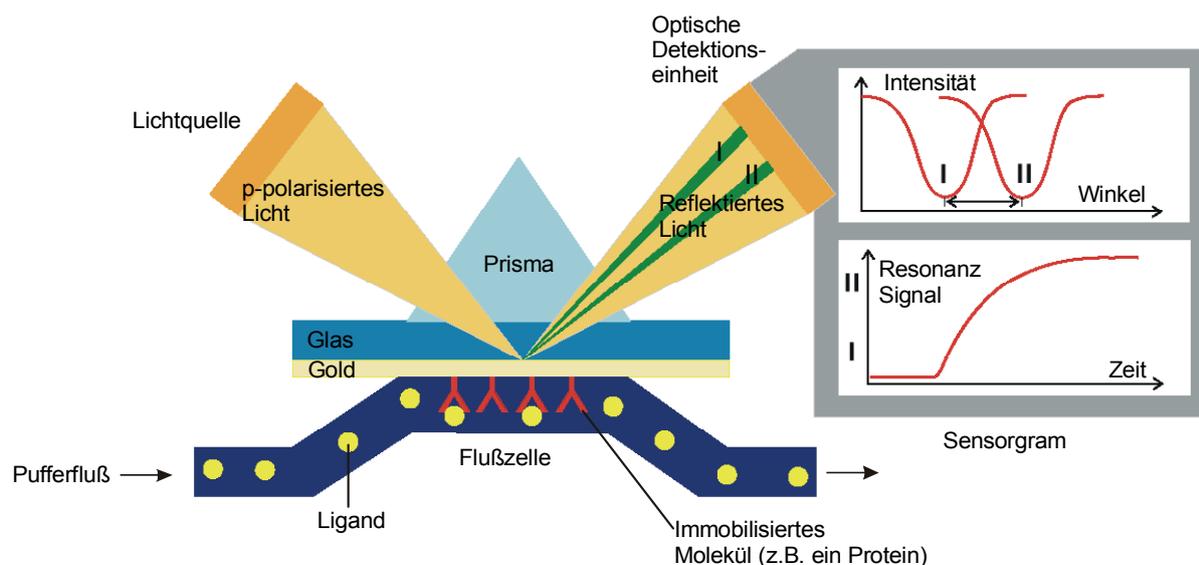


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Messprinzips der SPR. Planar polarisiertes Licht wird an der Grenzfläche zwischen einem optisch dünneren und optisch dichterem Medium reflektiert. Durch den Effekt der Oberflächenplasmonenresonanz kommt es in einem bestimmten Winkel zu einer Reduktion der Intensität des Lichtes, der Winkel hängt dabei von dem Brechungsindex an der Grenzfläche ab. Findet in der Flusszelle ein Bindungsereignis statt, dann ändert sich der Brechungsindex. Die Änderung des Winkels für das Intensitätsminimum des totalreflektierten Lichts wird als SPR-Signal aufgezeichnet.

Die SPR beruht auf dem Phänomen der Oberflächenplasmonenresonanz, das auftritt, wenn Licht von dünnen Metallfilmen reflektiert wird.⁷³ Mit der Methode können biospezifische Bindungsereignisse untersucht werden.⁷⁴ Je nach Gerät können nicht nur Proteine, sondern

auch Bakterien, Viren oder Zellen untersucht werden.⁷⁵⁻⁷⁷ Als Messsystem dient ein Sensorchip, der mit einer dünnen Goldfolie beschichtet und mit einer Matrix belegt ist (Abbildung 13). Auf der Matrix erfolgt die Immobilisierung eines der Bindungspartner, der zweite wird in einem Fließsystem über die Chipoberfläche geleitet. Der Bereich zwischen der Metalloberfläche und der Flusszelle stellt die Grenzfläche zwischen einem optisch dichteren und einem optisch dünneren Medium dar. Bei Auftreffen eines planar polarisierten Lichtstrahls auf den Metallfilm unter einem bestimmten Winkel kann ein Teil der Lichtenergie mit den delokalisierten Elektronen auf der Oberfläche wechselwirken. Dabei kommt es zu einer Reduktion der Intensität des reflektierten Lichtes. Der genaue Winkel hängt vom Brechungsindex zwischen dem optisch dichteren und dünneren Medium ab.

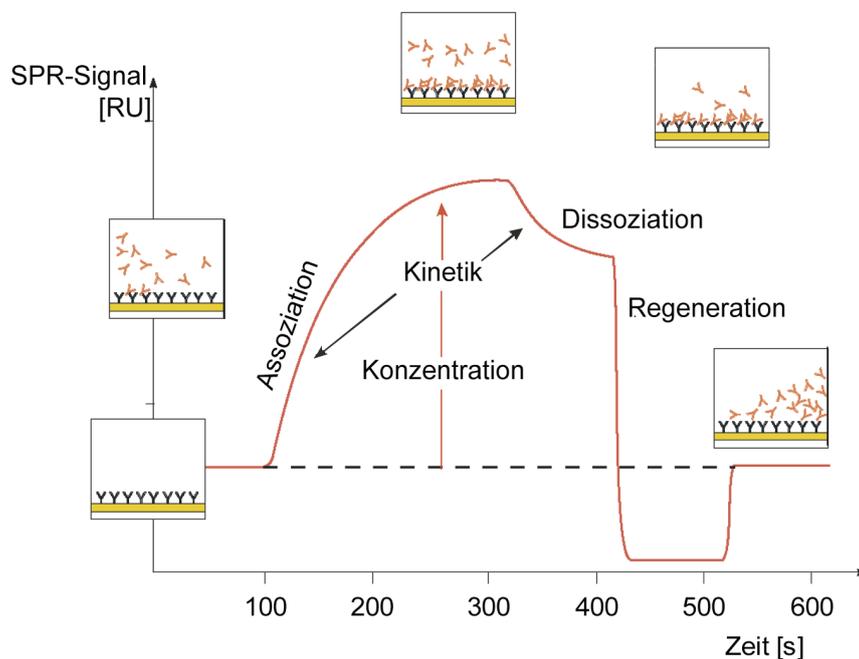


Abbildung 14: Sensorgramm einer SPR-Messung. Aus dem Verlauf der Assoziations- und Dissoziationskurven können die kinetischen Parameter des Bindungsereignisses ermittelt werden (k_1 und k_{-1}). Durch Aufnahme der Sensorgramme für eine Konzentrationsreihe lässt sich aus den jeweiligen Gleichgewichtswerten die Dissoziationskonstante K_D bestimmen.

$$RU = \frac{RU_{\max} [L]}{K_D + [L]}$$

Gleichung 6: Auswertung einer Konzentrationsreihe nach dem *one-site binding* Modell. RU_{\max} = Sättigungswert der Bindungskurve; K_D = Dissoziationskonstante; $[L]$ = Ligandkonzentration.

Findet ein Bindungsereignis an der immobilisierten Komponente statt, führt das zu einer Änderung des Brechungsindex in dem optisch dünneren Medium. Hieraus resultiert eine Änderung des Winkels bei dem Oberflächenplasmonenresonanz auftritt. Die Verschiebung des Intensitätsminimums wird in Echtzeit gemessen. Das Signal, das aufgezeichnet wird, entspricht der Änderung des SPR-Winkels und wird in RU (*response units*) in Form eines Differenzsensorgramms aus Messzelle und Referenzzelle ausgegeben (Abbildung 14). Durch die Messung gegen die Referenzzelle, auf der sich keine immobilisierte Komponente befindet, können unspezifische Bindungsereignisse an der Matrix ausgeschlossen werden. Im Falle eines spezifischen Bindungsereignisses kommt es zu einem Gleichgewichtszustand zwischen den Bindungspartnern. Die Bindung in Echtzeit ermöglicht eine Analyse der Bindungskinetik. Die Dissoziationskonstante kann durch Vermessen einer Konzentrationsreihe und durch *fit* an die Gleichung 6 erhalten werden - entsprechend der Gleichung 1 für die Bestimmung der Dissoziationskonstante mittels STD-NMR. Dafür werden die Gleichgewichtswerte der SPR-Antworten gegen die Ligandkonzentration aufgetragen. Die SPR-Methode kommt mit sehr geringen Substanzmengen aus, 1 RU entspricht in etwa 1 pg gebundener Substanz. Änderungen von bis zu 0.1 RU können detektiert werden.

2.3 Bestimmung der Enzymaktivitäten von Terpensynthasen mittels radiochemischer Methoden

Es gibt eine Vielzahl von Nachweisverfahren für die Aktivität von Enzymen, bei denen generell eine Substrat- oder Produktverfolgung durchgeführt werden kann. Für die Aktivität von Terpensynthasen hat sich ein radiochemisches Verfahren durchgesetzt.^{28;29;78} Alle Terpensynthasen gehen von Farnesyldiphosphat als gemeinsamem Substrat aus, das sich somit für jedes beliebige Enzym einsetzen lässt. Tritiummarkiertes [1-³H(n)]-Farnesyldiphosphat kann käuflich erworben werden. Tritium zerfällt unter Aussendung von β -Strahlung, die mit Hilfe eines Szintillationszählers quantifiziert werden kann. Der Assay wird in einem Zweiphasensystem durchgeführt. Nachdem das Enzym in einem wässrigen Puffersystem mit dem markierten Substrat versetzt ist, wird die Lösung mit einer organischen Phase (z.B. Hexan) überschichtet und inkubiert. Zur Detektion des gebildeten Produktes wird die wässrige Phase mit der organischen extrahiert und die organische Phase anschließend in dem Szintillationszähler vermessen. Im Kopf des Messgerätes befindet sich ein Szintillator, in dem durch ionisierende Strahlung ein Lichtquant ausgelöst wird. Die erzeugten Lichtquanten

werden in einen *photomultiplier* verstärkt und anschließend an einer Anode als elektrisches Signal detektiert. Die Intensität der ionisierenden Strahlung wird in cpm (*counts per minute*) oder in dpm (*disintegrations per minute*) angegeben.

2.4 Enzymkinetik von Progresskurven

Die Enzymkinetik liefert wertvolle Informationen über die Funktion und den Mechanismus biokatalysierter Reaktionen. Die einfachste Form einer Enzymreaktion ist eine irreversible Ein-Substrat-Reaktion, die durch das folgende Reaktionsschema beschrieben wird:



Dieses Reaktionsschema wurde erstmals von Michaelis und Menten aufgestellt. Die Geschwindigkeitsgesetze können bereits für diese einfachste Form nicht explizit gelöst werden. Michaelis und Menten postulierten eine Lösung die auf der Annahme basiert, dass $k_{-1} \gg k_2$ gilt und der Umsatz k_2 einer Kinetik 1. Ordnung folgt. Unter der Bedingung, dass das Substrat im Überschuss eingesetzt wird, stellt sich also ein Gleichgewicht für die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes ein und die Umsetzung des Produktes stellt den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dar. Das der Michaelis-Menten-Kinetik zugrunde liegende Konzept wurde später von Briggs und Haldane verallgemeinert, die darauf hinwiesen, dass die Bedingung $k_{-1} \gg k_2$ nicht für alle Enzymreaktionen erfüllt ist. Sie postulierten deshalb eine *steady state* Näherung in der sich die Konzentration des Enzymsubstratkomplexes bei Substratsättigung nicht ändert.^{79;80} Als Geschwindigkeitsgesetz ergibt sich:

$$v = \frac{d[\text{S}]}{dt} = -\frac{V_{\max}[\text{S}]}{K_M + [\text{S}]}$$

$$\text{mit } V_{\max} = k_{\text{cat}}[\text{E}]_0 \quad \text{und} \quad K_M = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1}$$

Gleichung 7: Geschwindigkeitsgesetz für eine enzymkatalysierte Reaktion nach Michaelis-Menten und Briggs-Haldane. V_{\max} = maximale Umsetzungsgeschwindigkeit; K_M = Michaelis-Menten-Konstante; $[\text{S}]$ = Substratkonzentration; k_{cat} = Geschwindigkeitskonstante der Umsetzung pro Enzymmolekül und pro Zeiteinheit unter der Bedingung der Substratsättigung; $[\text{E}]_0$ = Ausgangskonzentration des Enzyms.

Für die Bestimmung der kinetischen Parameter werden nur die Initialgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen gemessen, da hier die Bedingung der Substratsättigung erfüllt ist. Die Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit gegen die Substratkonzentration ergibt eine Sättigungskurve, analog zur Bestimmung der Bindungskonstanten, mit V_{\max} als Sättigungswert und K_M als Substratkonzentration bei $V_{\max}/2$ (vgl. Gleichung 1 und Gleichung 6). Gilt die Michaelis-Menten-Bedingung $k_{-1} \gg k_2$ entspricht die Michaelis-Menten-Konstante der Dissoziationskonstante des Enzym-Substrat-Komplexes ($K_M = K_D$). Gleichung 7 kann auch auf kompliziertere Reaktionsschemata angewendet werden. K_M und k_{cat} gehen dann in K'_M und k'_{cat} über, die die apparente Dissoziationskonstante und Geschwindigkeitskonstante über alle Teilschritte der Reaktion darstellen. Der Quotient k_{cat}/K_M wird als katalytische Effizienz bezeichnet und gilt als Maß für die Substratspezifität.⁸⁰

Die Analyse von Progresskurven stellt eine alternative Methode zur üblichen Michaelis-Menten-Kinetik dar, die den gesamten Verlauf einer Substrat-Zeit-Messung berücksichtigt und nicht nur die Initialgeschwindigkeiten. Dabei können weitere mechanistische Einblicke gewonnen werden, wie z.B. Informationen über Produktinhibition. Der experimentelle Aufwand kann sich insofern vereinfachen, dass alle kinetischen Parameter aus nur einem einzigen Experiment gewonnen werden können. Progresskurven lassen sich allerdings nur computergestützt analysieren, da es für die Michaelis-Menten-Gleichung keine explizite Lösung gibt.⁸¹⁻⁸³ Eine Möglichkeit der Auswertung besteht darin, eine Funktion zu finden, mit der die Daten gefittet werden können. Im Normalfall sollte es möglich sein den Konzentrations-Zeit-Verlauf durch eine Exponentialfunktion für eine Reaktion 1. Ordnung darzustellen. Durch Differentiation der Kurve an verschiedenen Stellen wird die jeweilige Geschwindigkeit des Enzymumsatzes zu verschiedenen Zeitpunkten erhalten. Durch Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit v gegen die Substratkonzentration lassen sich K_M und V_{\max} bestimmen.⁸⁴

Goudar *et al.* schlagen einen alternativen Weg vor.^{85;86} Sie gehen von der integrierten Form der Michaelis-Menten-Gleichung aus:

$$K_M \ln \left(\frac{[S]}{[S]_0} \right) + [S]_0 - [S] = V_{\max} t$$

Gleichung 8: Integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung.

Die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung lässt sich nicht nach $[S]$ auflösen, kann aber umgeformt werden:

$$[S] + K_M \ln([S]) = [S]_0 + K_M \ln([S]_0) - V_{\max} t$$

Substitution von $[S]$ durch ϕK_M gibt:

$$\phi K_M + K_M \ln(\phi K_M) = [S]_0 + K_M \ln([S]_0) - V_{\max} t$$

Nach Teilen durch K_M und Umformen erhält man:

$$\phi + \ln(\phi) = \frac{[S]_0}{K_M} + \ln\left(\frac{[S]_0}{K_M}\right) - \frac{V_{\max} t}{K_M}$$

Der linke Teil der Gleichung entspricht der Lambert-W-Funktion:

$$W(x) + \ln\{W(x)\} = \ln(x)$$

Gleichung 9: Die Lambert-W-Funktion. Sie ist die inverse Funktion zu $f(w) = we^w$, wobei w eine beliebige komplexe Zahl darstellt.

W entspricht dabei der Lambert-W-Funktion, x ist das Argument von W . Somit gilt für ϕ :

$$\phi = W\left\{\frac{[S]_0}{K_M} \exp\left(\frac{[S]_0 - V_{\max} t}{K_M}\right)\right\}$$

Wird durch Einsetzen von $\phi = [S]/K_M$ wieder zurücks substituiert, erhält man einen Ausdruck der die Substratkonzentration in Abhängigkeit von der Zeit wiedergibt und $[S]$ in Relation zu $[S]_0$, K_M und V_{\max} setzt:

$$[S] = K_M W\left\{\frac{[S]_0}{K_M} \exp\left(\frac{[S]_0 - V_{\max} t}{K_M}\right)\right\}$$

Gleichung 10: Die Gleichung stellt einen Ausdruck für $[S](t)$ dar, mit Abhängigkeiten von $[S]_0$, K_M und V_{\max} als Argument von W .

Abbildung 15 zeigt einen Plot der Lambert-W-Funktion für reale Werte von W . Es gibt drei Funktionsäste für Werte von x . Nur für den 1. Ast gibt es eine eindeutige Lösung für W , für Werte $-1/e < x < 0$ gibt es zwei Lösungen mit $W > -1$ und $W < -1$. Da $[S]_0$, K_M und V_{\max} immer

positiv sind, werden auch die Werte von x immer positiv sein. Somit sollte W für alle Werte von x eindeutig sein, wenn diese Lösung auf die Michaelis-Menten-Kinetik angewandt wird. Experimentelle Daten können mit Hilfe numerischer Methoden an diese Gleichung *gefittet* werden.^{87;88}

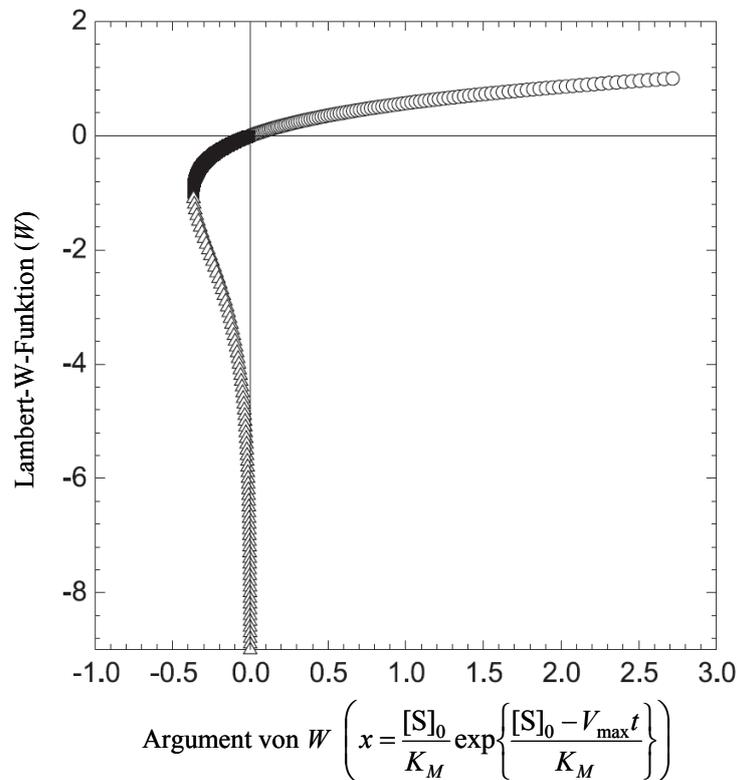


Abbildung 15: Die realen Äste der Lambert W Funktion. (○): 1. Ast für $x \geq 0$; (■): 2. Ast für $-1/e < x < 0$ und $-1 < W < 0$; (Δ): 3. Ast für $-1/e < x < 0$ und $W < -1$.

Die Lösung von Funktionen durch numerische Ansätze erfordert eine Abschätzung von Initialwerten. Diese können durch Linearisierungen der Gleichung 8 erhalten werden.⁸⁵ Durch jeweils unterschiedliches Umformen erhält man die drei folgenden Gleichungen:

$$\frac{t}{\ln([S]_0/[S])} = \frac{1}{V_{\max}} \frac{[S]_0 - [S]}{\ln([S]_0/[S])} + \frac{K_M}{V_{\max}}$$

Gleichung 11: 1. linearisierte Form der Gleichung 8.

$$\frac{[S]_0 - [S]}{\ln([S]_0/[S])} = V_{\max} - \frac{K_M}{t} \ln([S]_0/[S])$$

Gleichung 12: 2. linearisierte Form der Gleichung 8.

$$\frac{t}{[S]_0 - [S]} = \frac{K_M}{V_{\max}} \frac{\ln([S]_0/[S])}{[S]_0 - [S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Gleichung 13: 3. linearisierte Form der Gleichung 8.

2.5 *Molecular Modeling*

Durch die rasanten Entwicklungen in der Molekularbiologie steigt die Zahl der verfügbaren Information über Proteine laufend an. Leider ist die Erzeugung von 3D-Strukturdaten mittels Röntgenstrukturanalyse oder NMR-spektroskopischer Methoden ungleich aufwendiger als die Gewinnung von reinen Sequenzdaten. So sind in UniProtKB/TREMBL, einer Datenbank für Primärsequenzen von Proteinen, etwa 7 Mio. Einträge verzeichnet, während die PDB-Datenbank zum gegenwärtigen Zeitpunkt nur ca. 51 000 Strukturdaten von Proteinen und 55 000 Strukturdaten insgesamt enthält (Stand Januar 2009).⁸⁹⁻⁹¹ Für manche biologische Systeme ist die Erzeugung von Strukturdaten besonders schwierig, hierzu zählt z.B. die der Klasse der transmembranen G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die einen der wichtigsten Angriffspunkte in der Wirkstoffentwicklung darstellen.

Die Evolution von Proteinen verläuft strukturkonservativ, da die Funktion an dessen Struktur und nicht an die Primärsequenz gebunden ist. So können Proteine mit derselben Funktion aus verschiedenen Organismen sehr unterschiedliche Primärsequenzen aufweisen. Dabei gibt es aber bestimmte Sequenzbereiche, die für die Funktion des Proteins essentiell sind und deshalb nur eine geringe oder überhaupt keine Varianz aufweisen.⁸⁰ Die hohe Ähnlichkeit der Proteine im strukturkonservativen Bereich eröffnet die Möglichkeit des *homology modeling*, also das computergestützte Erstellen einer 3D-Struktur aus einer Primärsequenz auf Grundlage der experimentell erzeugten Strukturdaten eines verwandten Proteins.

Im ersten Schritt erfordert das *homology modeling* die Auswahl einer geeigneten *template*-Struktur. Mit Hilfe eines *alignment tools* kann ein sogenanntes *sequence alignment* auf einem Sequenzserver durchgeführt werden, ein Beispiel ist *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*). Das Tool vergibt nach bestimmten Kriterien Punkte. Das kann auf Grundlage einer hohen Übereinstimmung von Aminosäuren in den Sequenzen sein oder bei erfolgreicher Identifizierung von Domänen denen eine bestimmte Funktion zugeordnet wurde. Anhand der Bewertung, des *scores*, kann eine Auswahl der *templates* erfolgen. Das *homology modeling* selbst erfolgt über eine Software oder ein Webinterface auf einem externen Server. Neben weiteren Anbietern stellt das Biozentrum der Universität Basel ein solches Webinterface zur

Verfügung (*Swiss Model*). Für Sequenzen mit hoher Homologie zu anderen Proteinen kann das *modeling* voll automatisch durchgeführt werden, d.h. es wird nur die Sequenz übermittelt und der Server übernimmt das *alignment*, die Auswahl des *templates* und das Erstellen der Struktur. Alternativ steht eine Softwarelösung zur Verfügung, mit der die Randbedingungen des *modelings* interaktiv manipuliert werden können.⁹²⁻⁹⁴ Einen vergleichbaren Service bietet das Programm *Modeller* (*Departments of Biopharmaceutical Sciences and Pharmaceutical Chemistry and California Institute for Quantitative Biomedical Research, University of California San Francisco*).

Die Strukturen, die aus dem *homology modeling* erhalten werden, sind zunächst noch sehr an die *template*-Struktur angepasst. Durch Methoden des *molecular modelings* kann die Struktur weiter optimiert werden. Eine Methode ist die Minimierung, die der Verringerung der Molekülenergie dient. Dabei wird die Geometrie bezüglich der Bindungsabstände und Bindungswinkel verändert, so dass das gesamte System im Idealfall eine energetisch günstigere Struktur einnimmt. Die treibende Kraft ist eine Verringerung der Gesamtenergie des Moleküls. Deshalb können keine Energiebarrieren überschritten und nur lokale Energieminima erreicht werden.

Mit Hilfe von *molecular dynamic* (MD)-Simulationen kann das dynamische Verhalten eines Moleküls bei einer bestimmten Temperatur simuliert werden. Dabei wird der gesamte Konformationsraum abgesucht. Im Gegensatz zu der Minimierung wird den Atomen bei der MD-Simulation kinetische Energie zugeordnet (Temperatur des Systems). Dadurch können Energiebarrieren überschritten werden, so dass lokale Minima mit geringerer Energie oder im Idealfall sogar das globale Minimum erreicht werden kann.

Da die Berechnung komplexer Systeme, wie z.B. Proteine, für quantenmechanische Methoden zu aufwendig ist (*ab initio*), werden in der Regel kraftfeldbasierte Methoden angewandt. Typische Kraftfelder im Bereich der Biopolymere sind z.B. CHARM, AMBER, GROMOS und TRIPOS. Sie basieren auf den Gesetzen der klassischen Mechanik und der Annahme, dass Bindungslängen und Bindungswinkel zwischen Atomen Standardwerte einnehmen. Die Standardwerte können das Ergebnis quantenmechanischer Berechnungen sein oder aus experimentellen Strukturdaten stammen.⁹⁵

3 AUFGABENSTELLUNG

Die hydrophoben Effekte stellen eine der fundamentalen Wechselwirkungen dar, welche die Stärke der Bindung von kleinen organischen Molekülen an Proteine mitbestimmen. Im Gegensatz zu den elektrostatischen und polaren Wechselwirkungen beruht ihr Anteil an der Bindungsstärke nicht nur auf direkten intermolekularen Kräften, sondern resultiert zu einem großen Teil aus entropischen Effekten, die in der wässrigen Umgebung, in denen biologische Prozesse auftreten, begründet liegen. Eine in den vergangenen Jahren gestiegene Zahl potentieller hydrophober Wirkstoffkandidaten erfordert die Charakterisierung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen (SAR) solcher Verbindungen. Hieraus entsteht eine Notwendigkeit die bestehenden Methoden für die Untersuchung von Bindungseigenschaften hydrophober Ligand-Systeme zu erweitern. Die Probleme, die sich bei solchen Untersuchungen ergeben, sind von individueller Natur. Aufgrund des Löslichkeits- und Aggregationsverhalten sind bestimmte Konzentrationsbereiche möglicherweise nicht zugänglich oder es finden Bindungsereignisse in Konkurrenz zu der Proteinbindung in der Lösung statt. Die entropiegetriebene Natur der hydrophoben Wechselwirkung kann die Tendenz für unspezifische Wechselwirkungen mit einem *target*-Protein deutlich erhöhen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die (+)-Germacren D Synthase, ein Enzym, das die Bildung des Sesquiterpens (+)-Germacren D aus Farnesyldiphosphat (FDP) katalysiert, als ein Modellsystem für die Untersuchung von hydrophoben Ligand-Protein-Wechselwirkungen mittels STD-NMR ausgewählt. Ziel war es die Bindung von Farnesylmonophosphat, einem nicht umsetzbaren FDP-Substratanalogon, sowie das Bindungsereignis auf der Substrat- und Produktseite zu untersuchen. Hierfür war es zunächst notwendig ein geeignetes Puffersystem für das Protein zu etablieren, das Löslichkeits- und Aggregationsverhalten der Liganden in diesem Puffer zu charakterisieren und schließlich die Auswirkungen auf die eigentlichen Bindungsstudien zu evaluieren. Anhand von SPR- und STD-Titrations-Experimenten sollte gezeigt werden, dass die beobachteten Bindungsereignisse von spezifischer Natur sind und somit eine Bindung an das aktive Zentrum repräsentieren. Weiterhin sollte eine Ausweitung der STD-NMR-Methode auf die Untersuchung enzymatischer Reaktionen erprobt werden.

Um die Ergebnisse auf eine medizinisch relevante Fragestellung zu übertragen, wurde die Farnesylierungsreaktion der humanen Protein-Farnesyltransferase als ein zweites Enzym-Substrat-System für weitere Untersuchungen ausgewählt.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Voruntersuchungen an der (+)-Germacren D Synthase

Im Rahmen der Dissertation von Dr. Iris Fransson (geb. Altug) gelang die Isolierung der cDNAs, die die (+)- und (-)-Germacren D Synthase codieren, sowie deren funktionelle Expression in *E. coli*. Die cDNAs wurden dazu in den pRSET A Vektor mit einem T7-Promotor, einer Ampicillin-Resistenz und einem His-Tag kloniert und anschließend in den *E. coli*-Stamm BL21DE3 mittels Hitzeschock transformiert. Die transformierten Zellen wurden auf ampicillinhaltigen LB-Medium selektiert. Nach Induktion mit IPTG und Expression bei 16 °C über Nacht wurden die Germacren D Synthasen mittels Affinitätschromatographie an einer Ni-NTA-Säule isoliert. Die Enzyme konnten hinsichtlich ihrer kinetischen Parameter und des pH-Optimums charakterisiert werden.^{27;30}

Im Laufe dieser Arbeit wurden zum Teil zeitaufwendige NMR-Experimente an der (+)-Germacren D Synthase durchgeführt.¹ Hierfür musste ein geeignetes Puffersystem gefunden werden, in dem das Enzym eine ausreichende Stabilität besitzt und seine Aktivität über den Zeitraum des Experiments nicht verliert. Die Evaluierung erfolgte mit Hilfe eines radiochemischen Aktivitätsassays in Tris-Puffern unterschiedlicher Zusammensetzung. Vor der Durchführung der Aktivitätsassays erfolgte zunächst eine Untersuchung bezüglich der Enzymexpression und -isolierung, um die (+)-GDS möglichst effizient und in ausreichender Reinheit erhalten zu können.

4.1.1 Anpassung der Expressionsbedingungen

Die Expression der (+)-GDS sollte als eine grundlegende Methode dieser Arbeit zuverlässig und effizient durchführbar sein. Deshalb wurden mehrere Expressionsansätze und Proteinisolierungen durchgeführt und die Produkte mittels SDS-PAGE und Westernblot untersucht. Mit Hilfe eines GC/MS detektierten Enzymassays wurde anschließend die Funktionalität des isolierten Enzyms überprüft.

¹ Der Vektor pRSET A mit den klonierten cDNAs der (+)- und (-)-Germacren D Synthasen wurden freundlicherweise von Dr. Iris Fransson zur Verfügung gestellt.

Die Expressionsansätze wurden bei zwei unterschiedlichen Temperaturen durchgeführt. Zunächst wurde wie in der Arbeit von Dr. Iris Fransson beschrieben bei 16 °C exprimiert und anschließend bei 18 °C.²⁷ Der zweite Ansatz führte zu deutlich höheren Enzym-Rohausbeuten. Ein SDS-PAGE-Gel zeigte jedoch etliche Proteinverunreinigungen neben dem Hauptprodukt. Deshalb wurden die Imidazol-Konzentrationen in den Reinigungspuffern für die Ni-NTA-Affinitätschromatographie erhöht. Weiterhin wurden für die Affinitätschromatographie jeweils einmal eine *spin column* und eine *gravity flow column* verwendet. Die Produkte der Enzymreinigung wurden dem Enzymaktivitätsassay unterzogen. Es zeigte sich, dass die bei 18 °C durchgeführte Expression zwar höhere Ausbeuten ergab aber kein funktionelles Enzym lieferte. Wahrscheinlich führte die erhöhte Expressionsrate zur Bildung von *inclusion bodies* und somit zu einer Fehlfaltung des Proteins. Anhand der Ergebnisse wurde eine Arbeitsvorschrift für die Expression ausgearbeitet, mit der Ausbeuten von ca. 4-6 mg/L pro Expressionsansatz erzielt wurden (vgl. Abschnitt 8.3, S. 136).

Tabelle 3: Anpassung der Expressionsbedingungen. Die Isolierung der (+)-Germacren D Synthase aus dem Zellysate erfolgte mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie über eine *spin column* (SC) oder eine *gravity flow column* (GFC). ++: sehr hoch; + hoch; o: durchschnittlich; -: niedrig; --: sehr niedrig.

| Expressionsansatz | T [°C] | Enzymreinigung | Ausbeute (SDS-PAGE) | Reinheit (SDS-PAGE) | Enzymassay |
|-------------------|--------|----------------|----------------------|---------------------|----------------|
| 1 | 16 | SC | o | o | nicht getestet |
| 2 | 18 | SC | ++ (präzipitiert) | -- | negativ |
| 3a | 18 | SC | + | o | negativ |
| 3b | 18 | GFC | ++ | - | negativ |
| 4 | 16 | GFC | + | + | positiv |

Das Protein kann in Puffer-Glycerol-Lösungen (30%) eingefroren werden, ohne seine Aktivität zu verlieren.²⁷ Versuche, das Glycerol durch Umpufferung vollständig zu entfernen, gelangen nicht. Aufgrund von störenden Restsignalen des Glycerols bei späteren NMR-Messungen wurde das Enzym für alle Experimente frisch hergestellt. Versuche, einmal verwendete Enzymproben durch erneutes Umpuffern zurückzugewinnen, führten zu erheblichen Ausbeuteverlusten (> 90%).

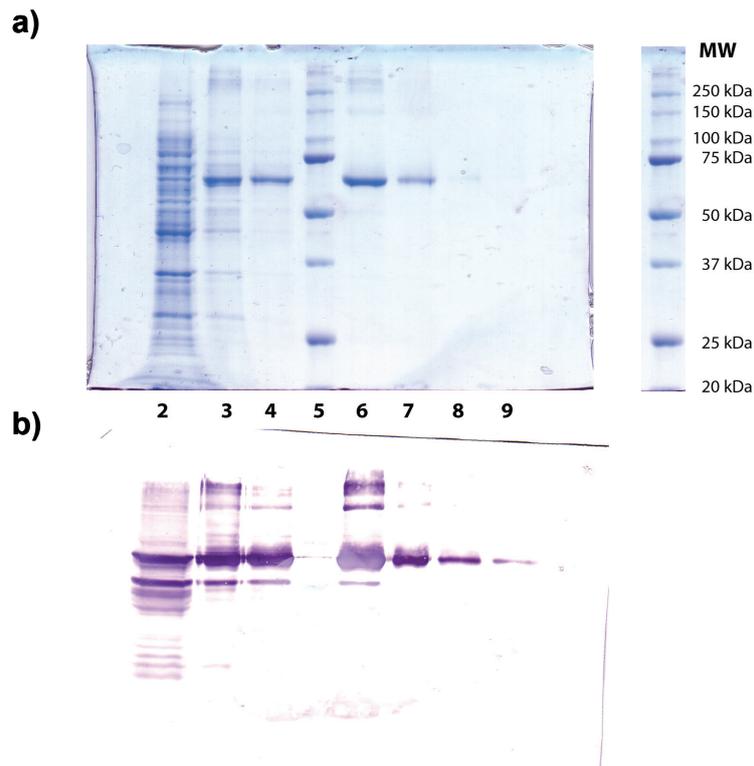


Abbildung 16: 7.5%-iges, mit Coomassie angefärbtes SDS-PAGE-Gel (a) und Western-Blot (b) nach Isolierung der (+)-Germacren D Synthase. Auftragung: Bahn 2: Zell-Lysat; Bahn 3-4: 1. und 2. Waschschrift; Bahn 5: Protein Marker; Bahn 6-9: 1.-4. Elutionsfraktion. Die Expression wurde bei 16 °C anhand der ausgearbeiteten Arbeitsvorschrift durchgeführt. Die Enzymreinigung mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie erfolgte unter Verwendung einer *gravity flow column*.

4.1.2 Aktivitätsmessungen an der (+)-Germacren D Synthase

Im Anschluss an die Expressionsversuche wurden mit Hilfe eines radiochemischen Enzymassays die Aktivität und die Lebensdauer des Enzyms in verschiedenen Puffern überprüft. Anhand dieser Experimente sollten geeignete Bedingungen für spätere NMR-spektroskopische Untersuchungen ermittelt werden, für die ein Erhalt der Aktivität über mehrere Tage gewährleistet sein muss.

In dem Assay wird tritiummarkiertes $[1\text{-}^3\text{H(n)}]$ -Farnesyldiphosphat in einem Zweiphasensystem umgesetzt (Hexan/Wasser). Damit das Enzym unter Substratsättigung arbeitet, wird dem Assay zusätzlich unmarkiertes FDP zugefügt. Die Enzymreaktion erfolgt in der wässrigen Phase, das Produkt geht in die organische Phase über. Nach Abtrennung der organischen Phase kann die Radioaktivität in einem Szintillationszähler bestimmt werden.

Im Laufe der Experimente zeigte sich eine sehr hohe Fehlervarianz des Enzymassays. Ein Vergleich mit den Daten aus der Dissertation von Dr. Iris Fransson zeigte auch in den von ihr durchgeführten Experimenten hohe Schwankungen. Diese können in einem Bereich von bis zu 50% liegen, erlauben in ihrer Tendenz jedoch eine Interpretation der Daten.²⁷ Um die Fehler einschätzen zu können, wurden die Messungen zweifach durchgeführt, sofern nicht anders angegeben. Bei der Auswertung der Daten wurde das Mittel der Doppelbestimmung verwendet, die Fehlerbalken in den gezeigten Graphen spiegeln die beiden Werte der Einzelbestimmung wider. Fiel ein Wert zu deutlich aus der Messreihe heraus, wurde er verworfen. Eine Zusammenstellung der Messdaten findet sich ab S. 140. Es wurden nur Messreihen gegenübergestellt, bei denen das Enzym aus demselben Expressionsansatz stammte und die parallel durchgeführt wurden.

Tabelle 4: Zusammensetzung der für die Enzymassays verwendeten Tris-Puffer. Die einzelnen Pufferverdünnungen wurden ausgehend von einem 10× konzentrierten Tris-Puffer hergestellt (100 mM bezogen auf Tris-HCl, vgl. Tabelle 23, S. 132). Der pH-Wert aller Puffer betrug 7.8.

| Verdünnung | Zusammensetzung | Bezeichnung |
|------------|--|-------------|
| 1.5× | 15 mM Tris-HCl, 225 mM NaCl, 6 mM NaN ₃ | 15 mM TBS |
| 2.5× | 25 mM Tris-HCl, 375 mM NaCl, 10 mM NaN ₃ | 25 mM TBS |
| 3× | 30 mM Tris-HCl, 450 mM NaCl, 12 mM NaN ₃ | 30 mM TBS |
| 5× | 50 mM Tris-HCl, 750 mM NaCl, 20 mM NaN ₃ | 50 mM TBS |
| 7.5× | 75 mM Tris-HCl, 1125 mM NaCl, 30 mM NaN ₃ | 75 mM TBS |

Das pH-Optimum der (+)-Germacren D Synthase liegt im Bereich von 7.5-7.8, so dass als Puffersystem ein Tris-Puffer gewählt wurde. Da das Enzym Magnesium als Cofaktor benötigt, wurde die Verwendung eines Phosphat-Puffers ausgeschlossen, der sich ebenfalls für diesen pH-Bereich eignen würde ($K_L \text{ Mg}_3(\text{PO}_4)_2 = 1.04 \cdot 10^{-24} \text{ mol}^5/\text{l}^5$).⁹⁶ Für die Überprüfung der Enzymstabilität wurde die (+)-GDS in Tris-Puffern unterschiedlicher Zusammensetzung und bei unterschiedlichen Enzymkonzentrationen gelagert. Im Abstand von zwei bis drei Tagen wurde die Aktivität der Enzymproben vermessen und Zeiträume von bis zu acht Tagen untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss von Dithiothreitol (DTT) als Antioxidationsmittel auf die Enzymstabilität überprüft. DTT war in deuterierter Form verfügbar und eignet sich somit als Pufferzusatz bei NMR-Experimenten. Als Puffer während der Assays wurde zunächst ein MOPSO-Puffer eingesetzt, der auch für die Bestimmung der

kinetischen Parameter in der Arbeit von Dr. Iris Fransson Verwendung fand (im Folgenden als Enzymassaypuffer 1 bezeichnet). Später wurde der Enzymassaypuffer 1 durch einen der evaluierten Tris-Puffer ersetzt (im Folgenden als Enzymassaypuffer 2 bezeichnet). Ferner wurde untersucht, welchen Einfluss die Temperatur auf die Lebensdauer des Enzyms besitzt und ob die katalytische Aktivität auch bei Temperaturen von unter 30 °C erhalten bleibt. Ein weiterer Assay wurde durchgeführt, um die Toleranz der (+)-GDS gegenüber den organischen Lösungsmitteln DMSO und TFE zu prüfen.

In einer ersten Untersuchung wurde das Enzym nach der Reinigung bei 4 °C im His-Tag-Elutionspuffer gelagert. Die Aktivität wurde direkt im Anschluss an die Enzymreinigung, am darauf folgenden Tag, nach drei und nach sechs Tagen vermessen (Abbildung 17).

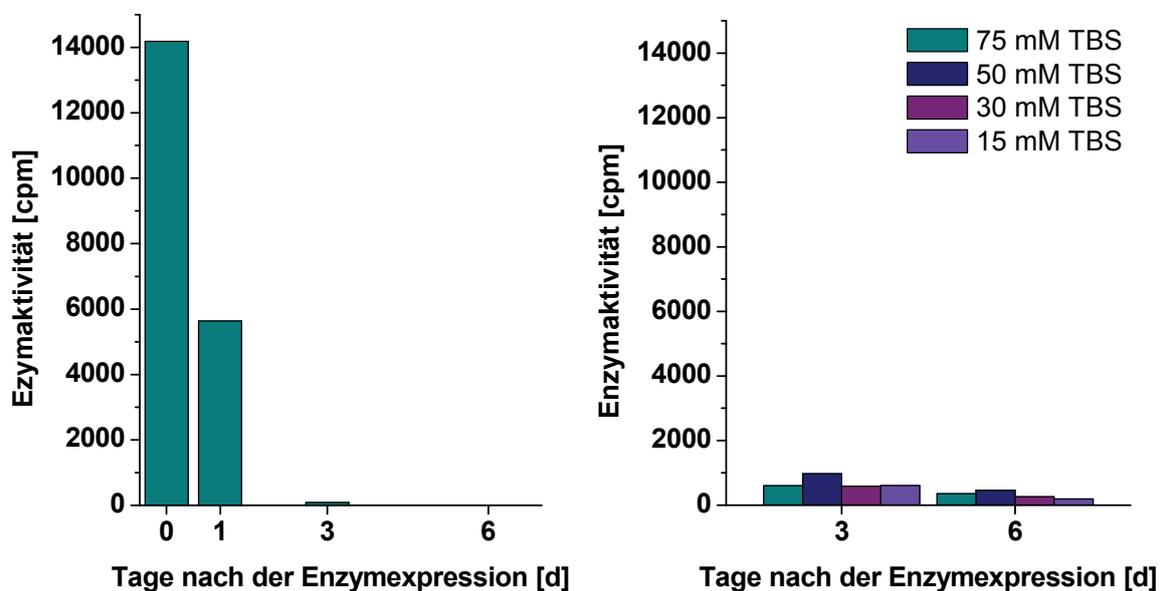


Abbildung 17: Enzymassays, durchgeführt im Enzymassaypuffer 1 bei 30 °C (Einfachbestimmung). Links: 5.2 μ M Stammlösung der (+)-Germacren D Synthase im His-Tag-Elutionspuffer, gelagert bei 4 °C. Bereits nach einem Tag war die Aktivität auf etwa 40% abgefallen, nach drei bzw. sechs Tagen war die Aktivität nicht mehr nachweisbar. Rechts: 1.8 μ M Stammlösungen der (+)-Germacren D Synthase in TBS verschiedener Konzentrationen (15, 30, 50 und 75 mM). Durch das Umpuffern gelang es den Aktivitätsverlust einzuschränken. Die Aktivität der (+)-Germacren D Synthase ist in dem 50 mM Tris-Puffer am höchsten.

Bereits nach einem Tag war die Enzymaktivität um mehr als die Hälfte gesunken, nach drei und nach sechs Tagen konnte keine nennenswerte Aktivität mehr festgestellt werden. Um auf den hohen Aktivitätsverlust nach nur einem Tag zu reagieren, wurde ein Teil des Enzyms im Anschluss an die Messung in TBS umpuffert. Dabei wurden vier Enzym-Lösungen in unterschiedlich konzentrierten Puffern angefertigt und diese ebenfalls bei 4 °C gelagert (15,

30, 50 und 75 mM TBS, Tabelle 4). Nach drei und nach sechs Tagen wurden die jeweiligen Enzymaktivitäten vermessen. Im Gegensatz zu der Probe im His-Tag-Elutionspuffer konnte für die Proben im Tris-Puffer auch nach sechs Tagen noch eindeutig eine Enzymaktivität festgestellt werden. Die Experimente zeigen, dass der Puffer für die Enzymreinigung destabilisierend auf die (+)-GDS wirkt und deshalb ein Umpuffern direkt nach der Isolierung notwendig ist.

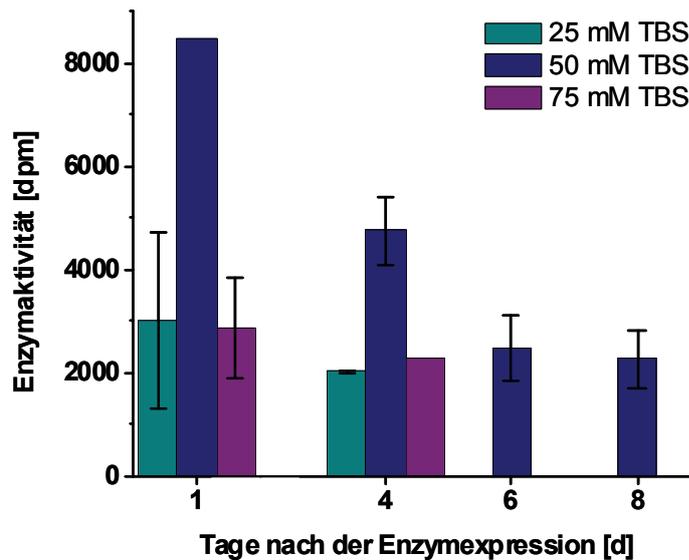


Abbildung 18: Enzymassay, durchgeführt im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C. 2.6 µM Stammlösungen der (+)-Germacren D Synthase in TBS verschiedener Konzentrationen (25, 50 und 75 mM), gelagert bei 4 °C. Die höchste Aktivität besitzt das Enzym in dem 50 mM Tris-Puffer. Verglichen wurden die Aktivitäten am ersten und am vierten Tag nach der Proteinreinigung. Für den 50 mM TBS wurde weiterhin überprüft, ob die Aktivität auch am sechsten und achten Tag nach der Expression erhalten blieb.

In der vorangegangenen Messreihe zeigte die (+)-Germacren D Synthase in dem 50 mM Tris-Puffer die höchsten Aktivitäten. Um diese Konzentration als geeignet zu verifizieren, wurden drei 2.6 µM Proben der (+)-GDS in 25, 50 und 75 mM TBS angesetzt und bei 4 °C gelagert (Abbildung 18). Weiterhin wurde der Enzym-Assay-Puffer 1 durch den 50 mM TBS (Enzym-Assay-Puffer 2) ersetzt, um festzustellen, ob der Pufferwechsel zu verringerten Aktivitäten innerhalb des Assays führt. Eine solche Aktivitätsminderung konnte nicht beobachtet werden. Auch in dieser Reihe zeigten die in den 50 mM TBS gelagerten Proben die höchste Aktivität. Am sechsten und achten Tag nach der Expression blieb die Aktivität relativ konstant, so dass für alle übrigen Experimente dieses Puffersystem verwendet wurde.

Für eine weitere Messreihe wurden vier Proben der (+)-Germacren D Synthase mit unterschiedlichen Konzentrationen angesetzt (2.3, 4.6, 7.7 und 10.2 μM). Die Proben wurden entweder bei 4 °C oder bei 19 °C gelagert und die Enzymaktivität über einen Zeitraum von sechs Tagen beobachtet. Zunächst wurde das Enzymassay einmal bei 30 °C und bei Raumtemperatur durchgeführt, wobei nur die bei 4 °C gelagerten Proben untersucht wurden. Dabei sollte festgestellt werden, ob die Reaktionstemperatur einen direkten Einfluss auf die Aktivität besitzt. Die Messungen wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt, eine Abhängigkeit der Aktivität von der Temperatur während des Assays war nicht festzustellen (Abbildung 19, gezeigt nur für die 4.6 und 7.7 μM Probe). Da die Experimente im Isotopenlabor durchgeführt werden mussten und keine Möglichkeit bestand das Assay unterhalb von Raumtemperatur durchzuführen, wurde auf eine entsprechende Messung verzichtet.

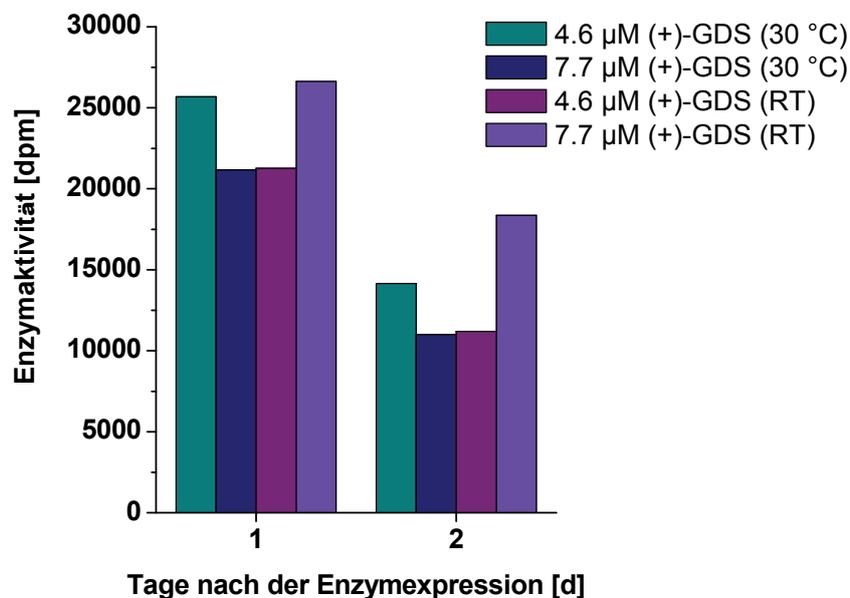


Abbildung 19: Enzymassay, durchgeführt im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C und bei Raumtemperatur (Einfachbestimmung). Die Proben wurden in 50 mM TBS bei 4 °C gelagert. Die Enzymaktivität liegt für beide Temperaturen in derselben Größenordnung.

Jeweils am dritten, vierten und sechsten Tag nach der Expression wurde die Aktivität der bei 4 °C gelagerten Proben mit den bei 19 °C gelagerten verglichen (Abbildung 20). Die Enzymaktivität bleibt über den Beobachtungszeitraum verhältnismäßig konstant, die Lagerungstemperatur scheint dabei keinen Einfluss auf die Aktivität auszuüben. Trotzdem konnte beobachtet werden, dass die (+)-GDS aus den bei 19 °C gelagerten Proben schneller

präzipitiert. Dieser Effekt war bei den beiden höher konzentrierten Proben deutlich stärker (7.7 und 10.2 μM).

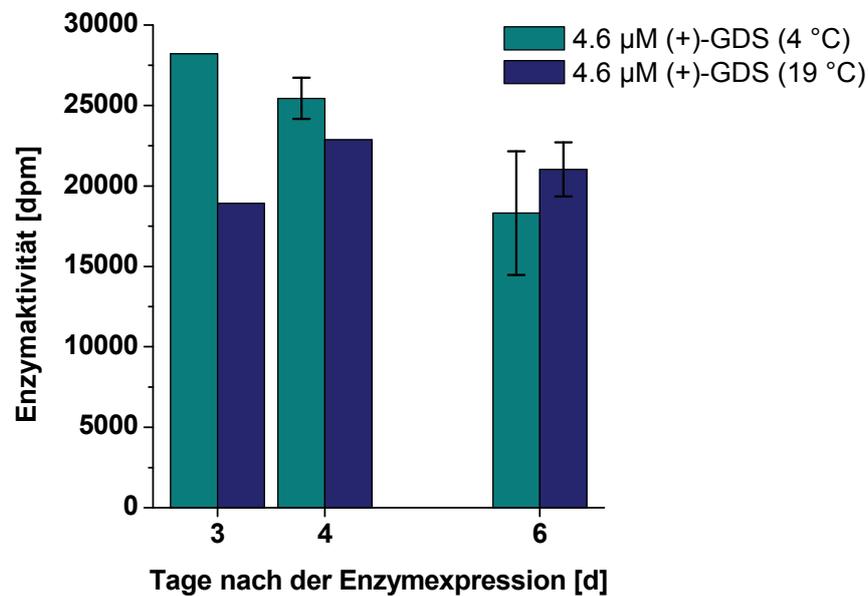


Abbildung 20: Enzymassay, durchgeführt im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C. Die Proben wurden in 50 mM TBS bei 4 °C und bei 19 °C gelagert und die Aktivität der (+)-Germacren D Synthase am dritten, vierten und sechsten Tag nach der Expression vermessen. Dabei scheint die Lagerungstemperatur keinen Einfluss auf die Enzymaktivität zu haben.

In den beiden zuletzt durchgeführten Messreihen zeigte sich für die Enzymaktivität keine Abhängigkeit von der Proteinkonzentration, was zu der Vermutung führte, dass das Assay nicht unter Substratsättigung verläuft. Für nachfolgende Experimente wurde deshalb die zugefügte Menge an unmarkierten Farnesyldiphosphat erhöht. Für die Durchführung einer weiteren Messreihe wurden fünf verschieden konzentrierte Proben der (+)-GDS in TBS (50 mM) angesetzt und diese bei 4 °C gelagert (0.9, 1.7, 2.6, 5.4, 9.7 μM). Die Enzymaktivität wurde nach einem, vier, sechs und acht Tagen vermessen (Abbildung 21). Im Vergleich zu vorhergehenden Messungen zeigte sich in dieser Reihe die erwartete Abhängigkeit der Aktivität von der Proteinkonzentration, so dass in den weiteren Experimenten die erhöhte Menge an zugefügtem Farnesyldiphosphat beibehalten wurde. Wie die Abbildung 21 zeigt, sinkt für alle Proteinkonzentrationen die Aktivität vom ersten auf den vierten Tag um 30-50%. Eine Ausnahme bildet die Probe mit einer (+)-GDS-Konzentration von 0.9 μM . Innerhalb der Fehlergrenzen bleibt die Aktivität aber in der darauf folgenden Zeit konstant.

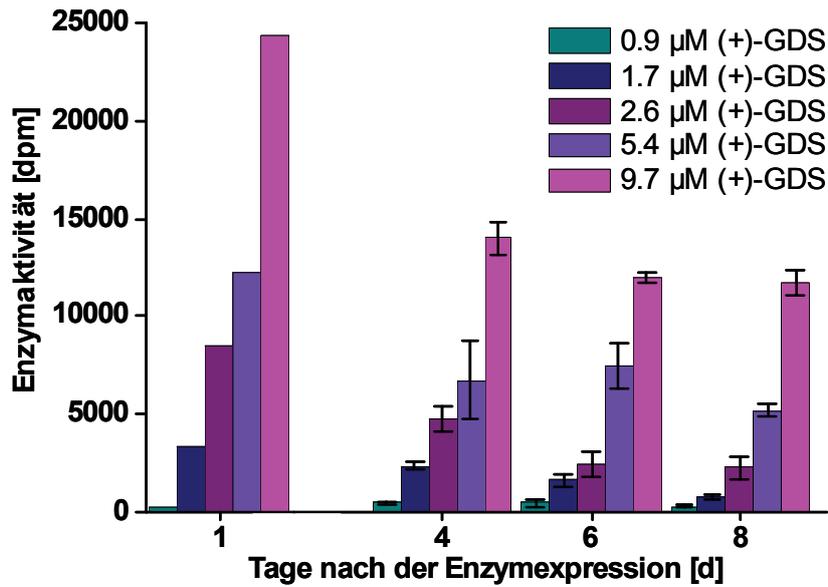


Abbildung 21: Enzymassay, durchgeführt im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C. Fünf Stammlösungen der (+)-Germacren D Synthase (0,9, 1,7, 2,6, 5,4 und 9,7 μM) wurden in 50 mM TBS angesetzt und bei 4 °C gelagert. Insbesondere vom ersten zum vierten Tag nach der Expression nimmt die Aktivität um 30-50% ab. Vom vierten auf den achten Tag ändert sich die Aktivität dann nur noch wenig.

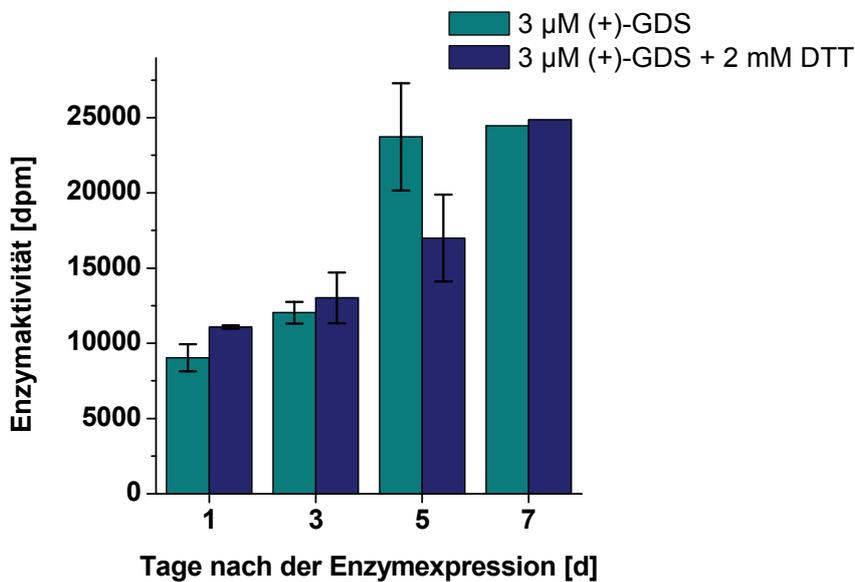
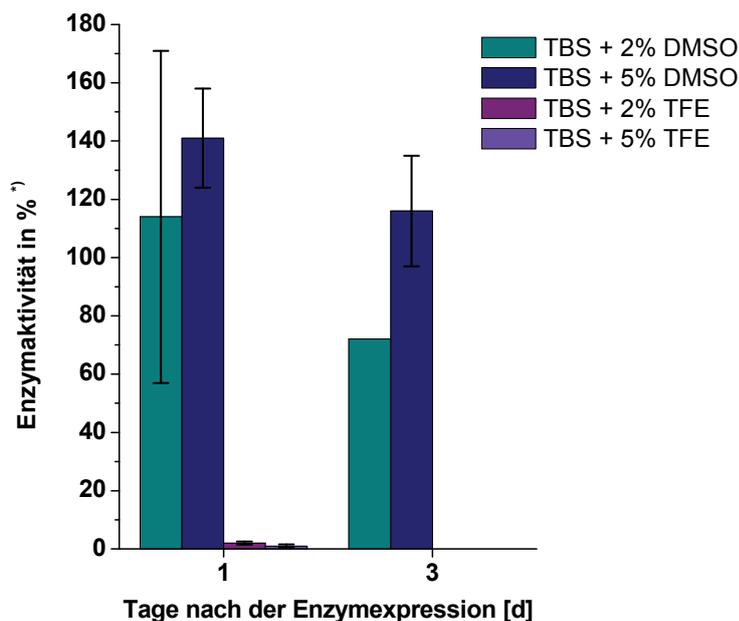


Abbildung 22: Enzymassay, durchgeführt im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C. Vergleich einer 3 μM Stammlösung der (+)-Germacren D Synthase in 50 mM TBS mit und ohne Zusatz von DTT. Beide Proben wurden bei 4 °C gelagert. DTT besitzt keinen Einfluss auf die Enzymaktivität.

Ferner wurde der Einfluss des Antioxidationsmittels DTT auf die Enzymaktivität überprüft. Die (+)-Germacren D Synthase besitzt in ihrer Sequenz sieben Cysteinreste, wobei mit

größter Wahrscheinlichkeit keine Disulfidbrücken vorhanden sind. Es wurden je drei Stammlösungen mit drei unterschiedlichen Enzym-Konzentrationen angesetzt und diese bei 4 °C gelagert (1.5, 3.0 und 4.5 µM Enzym mit und ohne 2 mM DTT). Die Enzymaktivität wurde nach einem, nach drei, nach fünf und nach sieben Tagen vermessen (Abbildung 22, gezeigt nur für die 3 µM Probe). Das Ergebnis war bei allen drei Konzentrationen identisch und es konnte kein Einfluss von DTT auf die Enzymaktivität beobachtet werden. Innerhalb der Messreihe wurde ein Anstieg in der Enzymaktivität über den Beobachtungszeitraum registriert. Dieser wurde für alle Konzentrationen verzeichnet und war unabhängig von der DTT-Zugabe. Eine Erklärung für die Aktivitätszunahme konnte nicht gefunden werden.

Abschließend wurde die Toleranz der (+)-Germacren D Synthase gegenüber den organischen Lösungsmitteln DMSO und TFE als Lösungsvermittler getestet. Diese könnten helfen die Löslichkeit der zu untersuchenden Liganden zu erhöhen. Abbildung 23 zeigt das Ergebnis der Enzymassays von vier 1.5 µM (+)-GDS-Lösungen in 50 mM TBS.



¹⁾ Verglichen zu der Enzymaktivität in TBS-Puffer ohne Zusatz nach 3 Tagen

Abbildung 23: Enzymassay, durchgeführt im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C. 1.5 µM Stammlösung der (+)-Germacren D Synthase in 50 mM TBS mit und ohne Zusatz eines Lösungsvermittlers (DMSO oder TFE, gelagert bei 4 °C). Während in Gegenwart von 2 und 5% DMSO die Enzymaktivität weitgehend erhalten bleibt, geht sie in Gegenwart von 2 und 5% TFE vollständig verloren.

Jeweils eine Probe wurde vor ihrer Lagerung mit 2% oder 5% DMSO bzw. 2% oder 5% TFE versetzt. Die in der Abbildung gezeigte Aktivität bezieht sich auf die Aktivität der (+)-GDS in reinem TBS, vermessen am dritten Tag nach der Expression. Wie die Experimente zeigen, bleibt die Aktivität in Gegenwart von DMSO vollständig erhalten. Im Gegensatz dazu geht sie in Gegenwart von TFE vollständig verloren. DMSO kann somit als Lösungsvermittler verwendet werden.

Zusammenfassend konnte ein geeignetes Puffersystem für nachfolgende NMR-Experimente gefunden werden. Die höchste Aktivität der (+)-Germacren D Synthase wurde in 50 mM TBS (50 mM Tris-HCl, 750 mM NaCl, 20 mM NaN₃, pH 7.8) verzeichnet. Im Gegensatz zu dem His-Tag-Elutionspuffer, der innerhalb von drei Tagen zu einem vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms führte, blieb die Enzymaktivität in dem Tris-Puffersystem auch über einen Zeitraum von acht Tagen erhalten. Weder die Lagerungstemperatur, noch die Temperatur bei der das Assay durchgeführt wurde, noch die Zugabe von DTT als Antioxidationsmittel hatten einen nachweisbaren Effekt auf die Beständigkeit der Enzymaktivität. Die Beobachtung, dass bei höherer Temperatur eine erhöhte Tendenz zur Präzipitation des Enzyms gegeben ist, führte allerdings zu der Entscheidung die NMR-Experimente mit der (+)-GDS bei 12 °C (285 K) durchzuführen. Aufgrund der hohen Fehlervarianz des Assays können keine eindeutigen Aussagen über Faktoren, welche die Messungen im Einzelnen beeinflussen, gemacht werden. In ihrer Tendenz legen die Assays einen Aktivitätsverlust innerhalb der ersten zwei bis drei Tage nahe, danach schienen die Aktivitäten der Enzymproben konstant zu bleiben. Aufgrund der aufwendigen Prozedur einer Enzymisolierung, der Umpufferung und dem Ansetzen einer NMR-Probe wurde mit der Durchführung entsprechender NMR-Experimente frühestens am zweiten Tag nach der Expression begonnen, so dass die Enzymaktivität im Folgezeitraum als konstant angenommen wird. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die (+)-GDS ohne Aktivitätsverlust bis zu 5% DMSO toleriert, so dass DMSO als Lösungsvermittler eingesetzt werden kann.

4.1.3 NMR-spektroskopische Voruntersuchungen

Die ersten Experimente in deuteriertem TBS mit der in den Enzymassay evaluierten Zusammensetzung haben gezeigt, dass die Pufferzusammensetzung für NMR-Untersuchungen ungeeignet ist. Die hohe Salzkonzentration führt bei Einstrahlung einer Pulssequenz zu einer ineffizienten Energieübertragung, woraus ungewöhnlich lange Einstrahlzeiten für die Standardpulse resultieren. Um diese zu umgehen, wurde bei allen

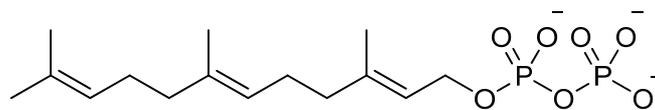
NMR-Experimenten mit einer NaCl-Konzentration von 300 mM statt 750 mM gearbeitet. Zur Überprüfung der Aktivität unter Messbedingungen wurde eine Probe in dem deuterierten Puffer angesetzt und bei 12 °C gelagert. Die Aktivität der Probe wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen dreimal getestet. Ein Aktivitätsverlust wurde nicht festgestellt (Messdaten S. 146). Die Zusammensetzung des NMR-Puffers war somit: 50 mM Tris-HCl-*d*₁₁, 300 mM NaCl, 20 mM NaN₃, pH 7.6-7.8. Magnesiumchlorid wurde vor jeder Messung frisch zugesetzt, wobei die Menge dem jeweiligen Experiment angepasst wurde. Da diese Pufferzusammensetzung bei allen in den folgenden Abschnitten beschriebenen Experimente beibehalten wurde, wird dieser in der Folge nur noch als TBS (in H₂O) bzw. *d*TBS (in D₂O) bezeichnet.

Für die Untersuchung von Protein-Ligand-Wechselwirkungen müssen geeignete Sättigungsparameter für das Protein ermittelt werden. Dabei hängen die STD-NMR-Experimente im Wesentlichen von drei NMR-spektroskopischen Parametern ab, dem Einstrahlpunkt, der Sättigungsleistung und der Sättigungsdauer. Diese Parameter müssen mit dem Liganden abgestimmt werden, um einerseits eine möglichst effiziente Proteinsättigung zu erreichen und andererseits Ligandartefakte durch ungünstige Messbedingungen einzugrenzen. Für die meisten Proteine hat sich eine Sättigungszeit von 2 s als effektiv erwiesen. Die Substanzen, die im Zusammenhang mit der (+)-Germacren D Synthase untersucht wurden, sind das Farnesyldiphosphat, das Farnesylmonophosphat und das Germacren D. Diese besitzen Ligandsignale im Bereich von 0.77 bis 5.77 ppm. Daraus ergibt sich die Möglichkeit die Sättigungspulse sowohl im aliphatischen Bereich als auch im aromatischen Bereich einzustrahlen. Der aromatische Bereich hat sich bezüglich der Sättigungseffizienz als etwas effektiver erwiesen. Als optimale Einstrahlfrequenz wurde 5250 Hz am 700 MHz Spektrometer ermittelt (7.5 ppm). Bei einer Leistung von 35 dB konnte eine Proteinsättigung von 25-40% erreicht werden. Wie sich im Verlauf der anschließenden Kapitel zeigen wird, sind diese Parameter gut mit den Eigenschaften der Liganden vereinbar.

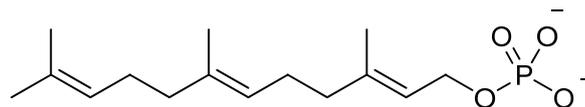
4.2 Charakterisierung der Liganden

Im folgenden Abschnitt wird die Charakterisierung der Liganden beschrieben, mit denen NMR-spektroskopische Untersuchungen durchgeführt werden sollten. Bei den Liganden handelt es sich um Farnesyldiphosphat, dem natürlichen Substrat der (+)-Germacren D Synthase, um Farnesylmonophosphat, einem nicht umsetzbaren

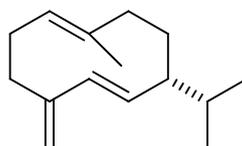
Substratanalogon des FDP, und um (+)-Germacren D, das Produkt der Enzymreaktion (Abbildung 24).



Farnesyldiphosphat, FDP



Farnesylmonophosphat, FMP



(+)-Germacren D, (+)-GD

Abbildung 24: Die in dieser Arbeit für Bindungsstudien ausgewählte Liganden. Das Farnesyldiphosphat ist das natürliche Substrat der (+)-Germacren D Synthase, das Farnesylmonophosphat ein Substratanalogon. Beide Verbindungen sind Amphiphile. Bei dem (+)-Germacren D, ein reiner Kohlenwasserstoff, handelt es sich um das Produkt der Enzymreaktion.

Im engeren Sinne handelt es sich bei einem Liganden um eine Substanz, die reversibel an ein Zielprotein bindet und im Gegensatz zu einem Substrat nicht umgesetzt wird. „Echte“ Liganden der (+)-GDS sind somit nur die Verbindungen FMP und (+)-GD (unter Vernachlässigung einer möglichen Rückreaktion), während es sich bei dem FDP um das Substrat handelt. Dem Umsatz des Substrates ist aber immer das Bindungsereignis an das Enzym vorgelagert. Mit der STD-NMR-Methode lässt sich dieses Bindungsereignis charakterisieren, was auch für das FDP gezeigt werden sollte. In der folgenden Diskussion werden, sofern es einer Vereinfachung des Textes und dem Leseverständnis dienlich ist, alle drei Verbindungen als Liganden zusammengefasst.

Neben einer vollständigen Zuordnung aller Protonensignale in den Messpuffern sollte vor allem das Verhalten der Liganden bezüglich einer Aggregation und Micellbildung untersucht werden. Für die STD Experimente war es wichtig zu zeigen, ob und in welchem Maße das

Löslichkeitsverhalten die Bindungsstudien mit dem Enzym beeinflussen würden. Weiterhin wurden die T_1 -Relaxationszeiten der Liganden bestimmt, da diese eine wichtige Rolle bei der Bestimmung der Bindungsepitope spielen können. Zusätzlich wurde überprüft, ob für die T_1 -Zeiten eine Abhängigkeit vom Aggregationsgrad festgestellt werden kann. Im Laufe der Experimente zeigte sich ein wesentlicher Einfluss der Magnesiumkonzentration in den Messpuffern auf das Aggregationsverhalten der Farnesylphosphate. Da Magnesiumionen von der (+)-Germacren D Synthase als Cofaktor benötigt werden, war eine genaue Charakterisierung dieser Abhängigkeit für den Ausgang der STD-Experimente mit dem Enzym essentiell.

4.2.1 Signalzuordnungen in den ^1H -NMR-Spektren der drei Liganden Farnesylmonophosphat, Farnesylidiphosphat und Germacren D

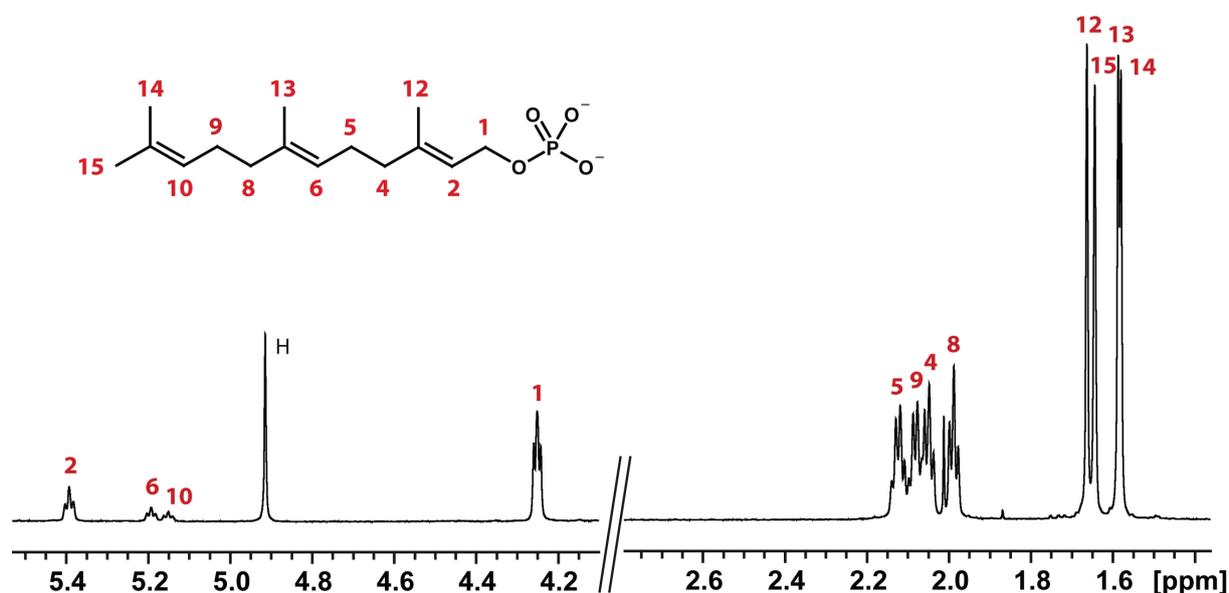


Abbildung 25: ^1H -NMR Spektrum (700 MHz) einer 500 μM FMP-Lösung in 10 mM NH_4HCO_3 in D_2O , pH 8. Die Zuordnung erfolgte unter Zuhilfenahme von 2D-Standard Experimenten. Spektren und Aufnahmeparameter: Tabelle 42, S. 153.

Abbildung 25 zeigt das 700 MHz ^1H -NMR-Spektrum von Farnesylmonophosphat in einer 10 mM NH_4HCO_3 -Lösung in D_2O . Die Signale zeigen sehr gute Dispersion, was auf eine gute Löslichkeit von FMP bei dieser Konzentration hinweist. Alle Signale konnten mit Hilfe von 2D-Standard Experimenten zugeordnet werden. Das Farnesylidiphosphat verhält sich in D_2O ähnlich und zeigt ebenfalls gut dispergierte Signale (Abbildung 26). Die Zuordnung erfolgte durch Vergleich der ^1H -NMR- und 2D-NOESY-Spektren mit dem des FMP. Durch den Einfluss der zweiten Diphosphatgruppe erfahren die Signale des FDP gegenüber dem FMP

eine Tieffeldverschiebung, die sich besonders auf die Protonen H-1, H-2, H-4 und H-12 auswirkt.

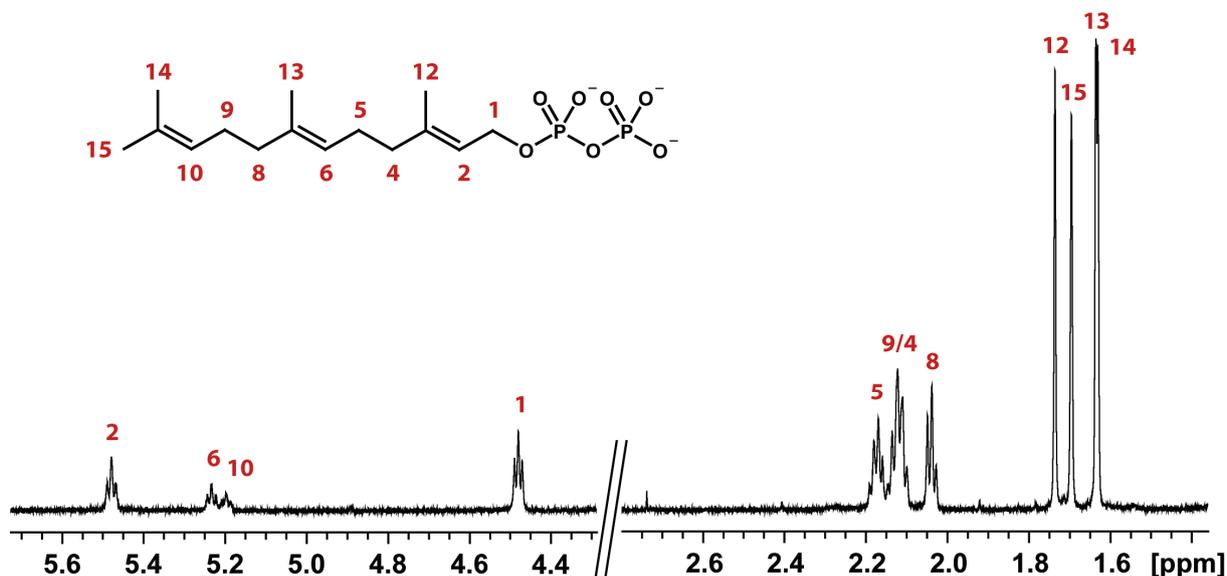


Abbildung 26: ^1H -NMR Spektrum (700 MHz) einer 156 μM FDP-Lösung in 0.05 M *d*TBS, pH 7.8. Die Zuordnung erfolgte unter zu Hilfenahme eines 2D-NOESY Spektrums und durch Vergleich der Spektren des FMP. Spektren und Aufnahmeparameter: Tabelle 43, S. 154.

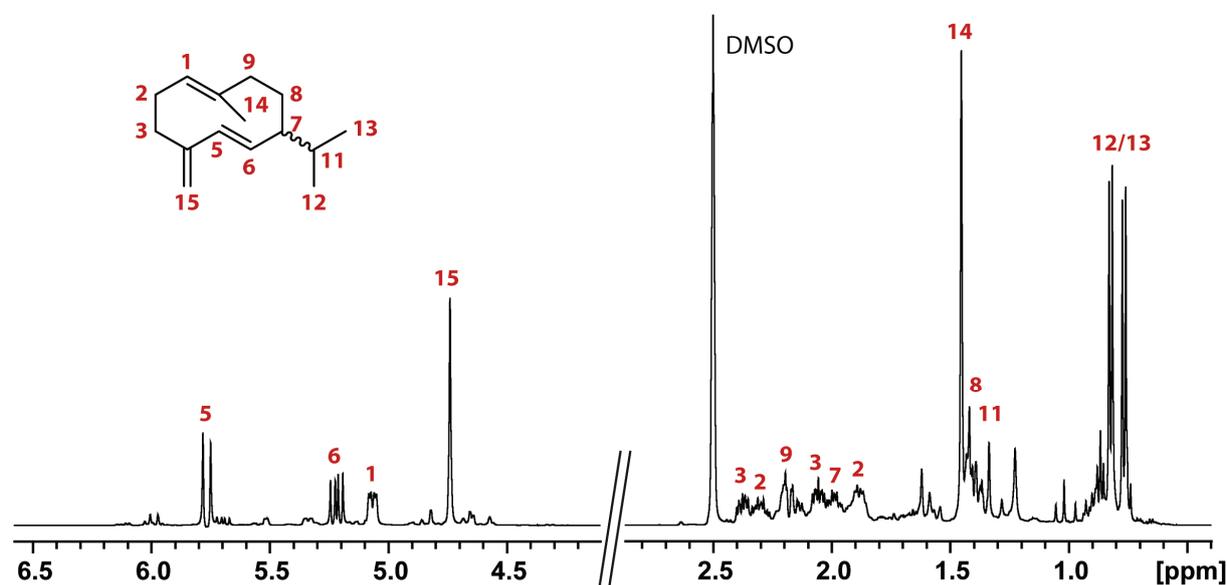


Abbildung 27: ^1H -NMR Spektrum von Germacren D in $\text{DMSO-}d_6$ (81% Reinheit, 150 mM). Die Zuordnung erfolgte unter zu Hilfenahme von 2D-Standard Experimenten (H,H-COSY , HSQC , HMBC , NOESY). Spektren und Aufnahmeparameter: Tabelle 44, S. 155.

Für die Charakterisierung von Germacren D war das (+)-Enantiomer nicht in ausreichenden Mengen verfügbar, um NMR-spektroskopische Untersuchungen durchzuführen. Deshalb

wurde für die Charakterisierung und die Löslichkeitsversuche das (-)-Enantiomer verwendet, das als 40%ige Probe von der Firma *R. C. Treatt* zur Verfügung gestellt wurde (Germacrene D Natural, 40%). Eine Anreicherung der Probe auf 81% gelang mittels präparativer GC. Die aufgefangenen Fraktionen wurden in $\text{DMSO-}d_6$ gelöst und die Konzentration gegen eine Vergleichsprobe über die Peakflächen per GC bestimmt (12 mg/mL). Die Enantiomerenzuordnung erfolgte durch Bestimmung des optischen Drehsinns und mittels enantioselektiver GC gegen eine Referenzprobe. Die Charakterisierung des Germacren D erfolgte zunächst in reinem $\text{DMSO-}d_6$ (Abbildung 27). Die vollständige Zuordnung der Signale erfolgte wieder mit Hilfe von 2D-Standard Experimenten.

4.2.2 Löslichkeitsverhalten von Germacren D

Im Gegensatz zu den Amphiphilen FMP und FDP ist das Germacren D ein reiner Kohlenwasserstoff, der nahezu unlöslich in Wasser ist. Deshalb wurde versucht, durch Zusatz eines Lösungsvermittlers Spektren in wässrigem Medium zu erhalten. Da gezeigt werden konnte, dass DMSO durch die (+)-GDS toleriert wird, wurde dieses als Lösungsvermittler gewählt. Für die Löslichkeitsversuche wurden Spektren in $\text{D}_2\text{O/DMSO-}d_6$ -Gemischen mit unterschiedlichen Anteilen an $\text{DMSO-}d_6$ (5-20%) akquiriert. Hierfür wurde die mittels präparativer GC erhaltene (-)-GD Stammlösung mit einer entsprechenden Menge an $\text{DMSO-}d_6$ versetzt und dann mit D_2O auf 600 μL aufgefüllt. Nach kurzem Schütteln mit dem Vortex-Mischgerät und dem Überführen in ein NMR-Röhrchen wurde die Probe für 1 min mit Ultraschall behandelt. Die so hergestellten Proben wiesen eine deutliche Trübung auf, die auf Emulsionsbildung zurückzuführen war (Abbildung 28).



Abbildung 28: Vergleich zweier NMR-Proben von (-)-Germacren D. Links: in $\text{DMSO-}d_6$; rechts: in $\text{D}_2\text{O/DMSO-}d_6$ (5%). Es zeigt sich in der rechten Probe eine deutliche Trübung, die auf Emulsionsbildung hindeutet.

Die Emulsionsbildung zeigte sich bereits für die Probe mit einem Anteil von 20% DMSO- d_6 , bei Anteilen darunter nahm die Emulsionsbildung noch deutlich zu. Von jeder Probe wurden jeweils ein ^1H - und zwei STD-Spektren mit unterschiedlichen Einstrahlpunkten aufgezeichnet (bei -1 und bei 7.5 ppm). Ein Vergleich der Signalintensitäten in den beiden *off-resonance* Spektren zeigt, dass die Konzentration an (-)-Germacren D über den Zeitraum der Messung konstant blieb. Bei Lagerung im Kühlschrank trat innerhalb von 1-2 Wochen eine langsame Entmischung bis zur Auflösung der Trübung ein. Im Anschluss aufgezeichnete Spektren zeigten nur noch Restsignale von (-)-GD.

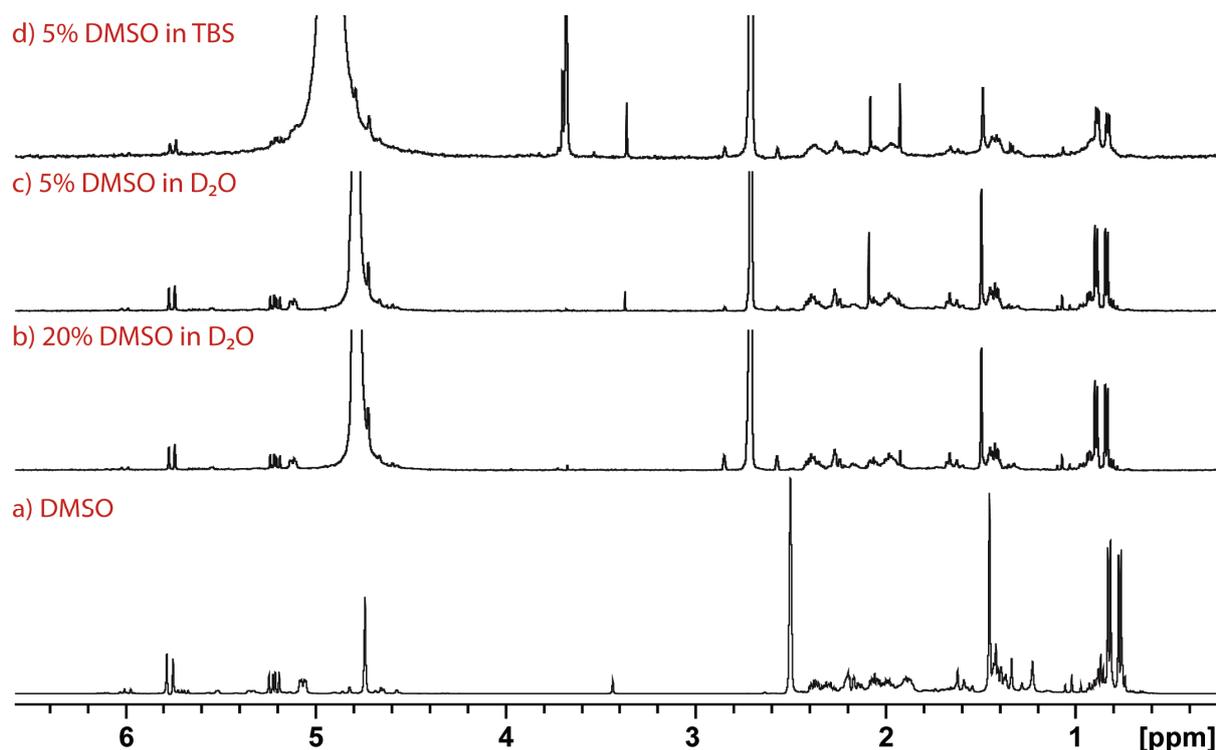


Abbildung 29: Vergleich der ^1H NMR Spektren von (-)-Germacren D in DMSO- d_6 (a), $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-}d_6$ -Gemischen (b+c) und in $d\text{TBS}/\text{DMSO-}d_6$ (d). Die NMR-Proben der Spektren (b)-(d) zeigten eine deutliche Trübung durch Emulsionsbildung. Trotzdem konnten Spektren mit verhältnismäßig guter Auflösung aufgezeichnet werden. Die Proben scheinen sich wie ein Zweiphasensystem zu verhalten. Die Tröpfchen sind NMR-spektroskopisch nicht detektierbar, nur der Anteil der (-)-Germacren D Moleküle in Lösung. Die Elektrolytkonzentrationen scheinen die Löslichkeit (-)-des Germacren D weiter zu erniedrigen. Aufnahmeparameter: Tabelle 44, S. 155.

Trotz der Emulsionsbildung konnten Spektren in $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-}d_6$ -Gemischen mit guter Auflösung und Empfindlichkeit erhalten werden. Im Bereich der Methylenprotonen kommt es gegenüber dem DMSO- d_6 -Spektrum zu etwas stärkeren Signalüberlagerungen, die Signale können aber immer noch anhand der durchgeführten Zuordnungen identifiziert werden. Die

gute Auflösung der Spektren weist darauf hin, dass nur der lösliche Anteil des Germacren D detektierbar ist. Diejenigen Moleküle, die sich in den Tröpfchen befinden, scheinen in dem Spektrum nicht sichtbar zu werden. Die Spektren (b) und (c) aus Abbildung 29 sehen trotz des deutlich geringeren Anteils an DMSO- d_6 in Spektrum (c) nahezu identisch aus. Dagegen weist das Spektrum in d TBS eine stärkere Linienverbreiterung auf. Die chemischen Verschiebungen unterscheiden sich kaum gegenüber denen der D₂O-Proben und können gut zugeordnet werden. Die hohe Elektrolytstärke des Puffers wirkt sich erwartungsgemäß negativ auf die Löslichkeit von Germacren D aus. Die Linienverbreiterungen weisen auf veränderte Diffusionseigenschaften der Kohlenwasserstoffmoleküle mit ihren Hydrathüllen hin. Alle aufgezeichneten STD-Spektren zeigten keine Artefakte, was auf einen langsamen Austausch für das Germacren D zwischen der wässrigen Phase und den Tröpfchen der Emulsion hinweist.

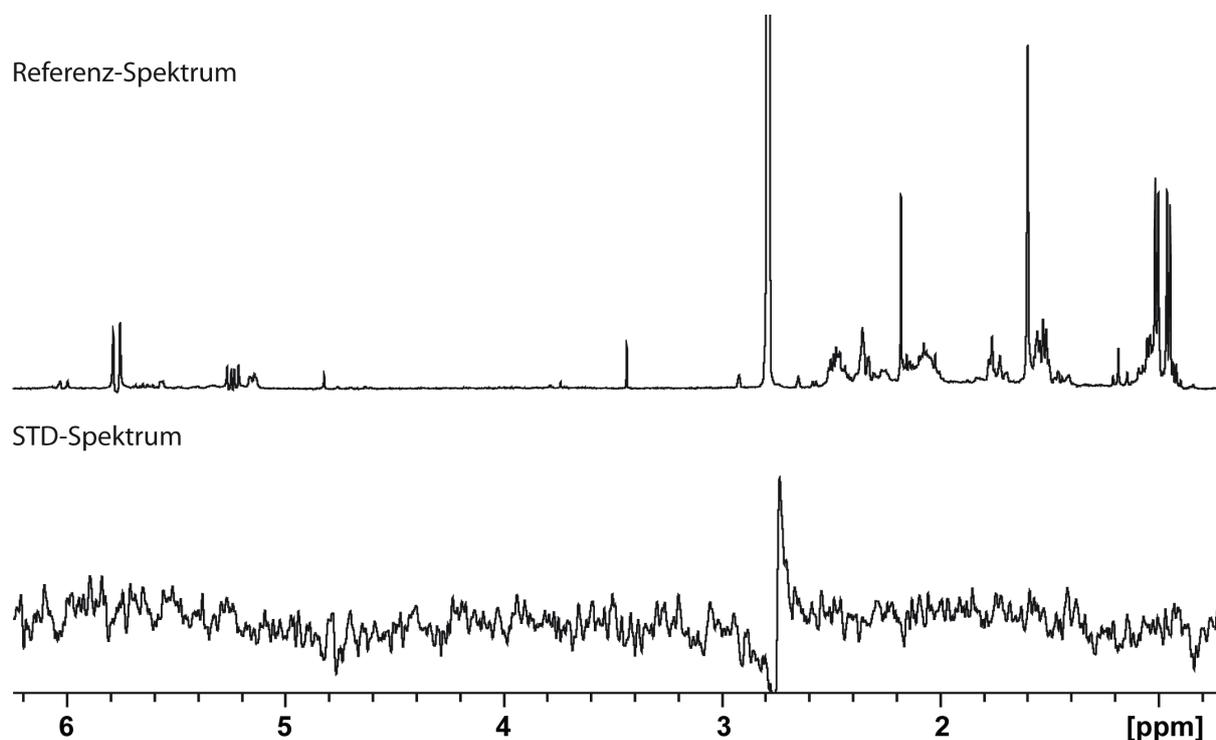


Abbildung 30: 500 MHz STD-Spektrum von (-)-Germacren D in D₂O/DMSO- d_6 (5%). Das STD-Spektrum weist keinerlei Artefaktsignale auf. Das Dispersionssignal um 2.5 ppm resultiert von dem DMSO- d_6 -Restsignal. Aufnahmeparameter: Tabelle 57, S. 162.

4.2.3 Löslichkeitsverhalten von Farnesyldiphosphat

Im Laufe der Untersuchungen stellte sich heraus, dass das Löslichkeitsverhalten der Farnesylphosphate von der Konzentration der Magnesiumionen im Messpuffer abhängt. Abbildung 31 zeigt zwei ¹H-NMR-Spektren von Farnesyldiphosphat in d TBS/DMSO- d_6

(95:5) vor (a) und nach der Zugabe von MgCl_2 (1 mM, b). Beide Spektren wurden mit identischen Parametern akquiriert. Die Intensitäten der FDP-Signale liegen für das Spektrum (b) nur noch bei etwa 45% gegenüber denen im Spektrum (a). Die Auflösung der Signale nimmt zusätzlich etwas ab. Der starke Einbruch der FDP-Intensitäten weist auf die Bildung von Aggregaten in Form von Micellen hin, was eine Verkürzung der T_2 -Relaxationszeiten zur Folge hat und in einer extremen Linienverbreiterung resultiert. Die Aggregation wirkt sich weiterhin auf die Intensität des Tris- und des DMSO-Signals aus, hier liegt die Reduktion aber nur bei etwa 25% (vgl. Abbildung 32). Denkbar wäre ein Einschluss dieser Moleküle in das Micellinnere oder eine Beteiligung an der Bildung der Micellen. Bei Integration über das gesamte Spektrum liegt die Intensitätsverringeringung noch bei ca. 33%. Die Linienverbreiterung der Aggregate muss somit sehr groß sein. Bei der in diesem Fall untersuchten Probe kam es nach einigen Stunden zur Präzipitation von FDP-Micellen, so dass die Micellkonzentration im Sättigungsbereich der Lösung liegen muss.

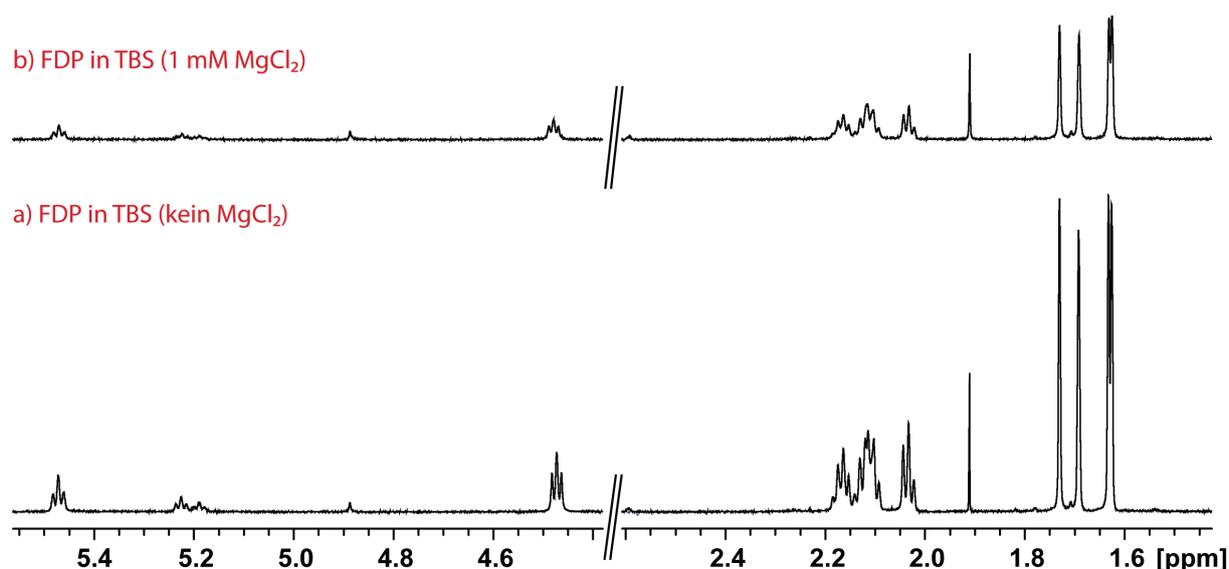


Abbildung 31: a) ^1H -NMR Spektrum (700 MHz) einer 500 μM FDP-Lösung in $d\text{TBS}/\text{DMSO-}d_6$ (95:5), pH 7.8. b) ^1H -NMR Spektrum (700 MHz) derselben Probe wie in (a) nach Zufügen von 1 mM MgCl_2 . Ein Vergleich der Signalintensitäten zeigt, dass diese in Gegenwart von MgCl_2 auf ca. 45% des ursprünglichen Wertes abfallen. Aufnahmeparameter: Tabelle 58, S. 163.

Im Gegensatz zu der Emulsionsbildung von Germacren D bildet Farnesyldiphosphat Micellen, die sich weiterhin in Lösung befinden. Die vorliegende Probe stellt somit kein Zweiphasensystem, sondern weiterhin eine homogene Lösung dar. Zwischen FDP-Monomeren in Lösung und in den Micellen findet ein schneller chemischer Austausch statt. Durch die Verkürzung der T_2 -Relaxationszeiten sollte der Effekt der Spindiffusion innerhalb

der Aggregate auftreten. Weiterhin sollte durch die Linienverbreiterung eine Sättigung der Aggregate außerhalb der chemischen Verschiebungen der FDP-Signale möglich sein, so dass im STD-Spektrum Artefakt-Signale zu erwarten sind. Aufgrund des Gleichgewichtes zwischen assoziierten und freien FDP-Molekülen wird die Sättigung aus den Aggregaten in Lösung transferiert und dort mit T_1 abgebaut. Daraus resultiert eine Intensitätserniedrigung im *on-resonance* gegenüber dem *off-resonance* Spektrum. Ein Vergleich der STD-Spektren beider Proben, FDP in *d*TBS/DMSO-*d*₆ mit und ohne MgCl₂, demonstriert das Auftreten der Artefakte (Abbildung 32, Tabelle 5). In Abwesenheit des Magnesiums treten Artefaktssignale nur in geringem Maße und nur für die Methylprotonen auf (0.4-0.6 STD%). Durch die Zugabe des Magnesiumsalzes steigen die STD-Signale der Methylprotonen auf 7-10% an. Weiterhin werden jetzt auch die Methylen- (5-6 STD%) und Olefinprotonen (7-9 STD%) im STD-Spektrum sichtbar. Die Artefaktssignale der Methylprotonen steigen um einen Faktor von 20 und verdeutlichen die Sensitivität des STD-Experiments gegenüber der Aggregation.

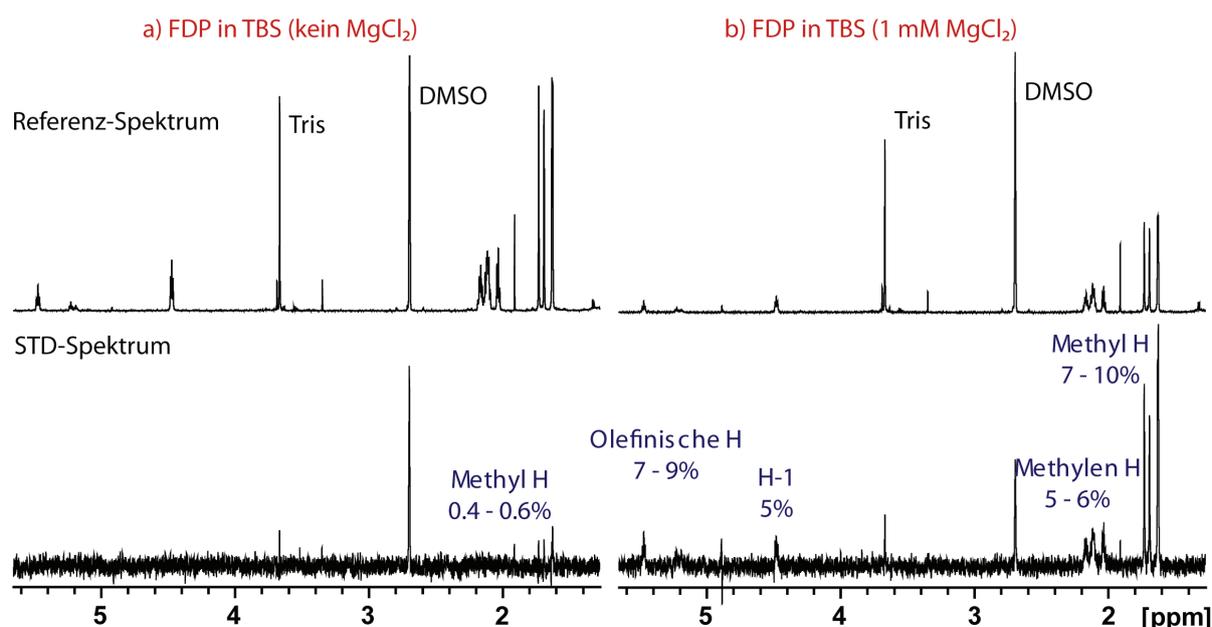


Abbildung 32: ¹H- und STD-Spektren (700 MHz) derselben Proben wie in Abbildung 31. Gleichzeitig mit der Reduktion der Signalintensitäten im Referenzspektrum in (b) steigen die Signalintensitäten in dem STD-Spektrum deutlich an. Die Zugabe des MgCl₂ in (b) führt zu der Bildung von Micellen. Aufgrund der hohen Linienbreiten sind diese nicht direkt detektierbar, indirekt aber über die STD-Artefaktmessung. Aufnahmeparameter: Tabelle 58, S. 163.

Aufgrund der starken Zunahme der Artefaktbildung und des außerordentlichen Intensitätsabfalls der ¹H-NMR-Signale wird davon ausgegangen, dass es sich bei den Aggregaten um Micellen mit einer beachtlichen Anzahl an Monomeren handeln muss. Die

Magnesiumionen vermitteln offensichtlich intermolekular zwischen FDP-Molekülen und erhöhen so die Tendenz der Micellbildung. Aufgrund des starken Einflusses der Magnesiumionen auf die Löslichkeit von FDP mussten die Messbedingungen für die STD-Experimente sorgfältig evaluiert werden. Hierbei musste dann wiederum berücksichtigt werden, dass Studien an verschiedenen magnesiumabhängigen Enzymen eine beträchtliche Abhängigkeit der Aktivitäten von der Magnesiumkonzentration gezeigt haben.^{35,97}

Tabelle 5: Artefaktsignale für das Farnesyldiphosphat in An- und Abwesenheit von MgCl₂ in *d*TBS. Für die Zuordnung der Protonenresonanzen vgl. Abbildung 26, S. 51. Die Intensitäten sind in Prozent angegeben.

| <i>c</i> (FDP) [μM] | <i>c</i> (MgCl ₂) [mM] | H-1 | H-2 | H-4/ H-9 | H-5 | H-6 | H-8 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|------------------------|---------------------------------------|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| 500 | 0 | – | – | – | – | – | – | – | 0.4 | 0.4 | 0.6 | 0.4 |
| 500 | 1 | 5.2 | 8.3 | 4.9 | 4.9 | 7.6 | 5.8 | 9.4 | 8.4 | 8.4 | 10.3 | 7.3 |

Im Folgenden werden verschiedene Experimente beschrieben, die der Charakterisierung des Löslichkeitsverhaltens von Farnesyldiphosphat in *d*TBS dienen. Farnesyldiphosphat wurde zu diesem Zweck zu Tris-Puffern mit unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen titriert. Durch Zugabe von Ethylenglycol bzw. Imidazol als interne Standards wurde die erwartete Signalintensität von FDP mit der tatsächlichen verglichen. Weiterhin wurden STD-Spektren für jede FDP-Konzentration aufgezeichnet. Um das Präzipitieren von FDP zu verhindern, wurde im Gegensatz zu den oben diskutierten Experimenten, die maximale FDP-Konzentration auf ca. ein Drittel reduziert (153.3 μM). Die Abbildung 33 zeigt den per NMR-Spektrum bestimmten Konzentrationsverlauf von FDP für das erste durchgeführte Experiment. Die Konzentration an MgCl₂ betrug zu Beginn der Titration 0.1 mM. Die Zugabe an FDP (2.5 mM in *d*TBS) erfolgte nach der Tabelle 6. Für jede Konzentration wurden ein STD- und jeweils ein ¹H-NMR-Spektrum vor und nach dieser Messung akquiriert. Nach dem fünften Titrationspunkt wurde die Konzentration an MgCl₂ auf 0.2 mM erhöht. Die Verringerung der FDP-Konzentration resultiert aus der Verdünnung. Ohne eine Zugabe von FDP wurden zunächst zwei weitere ¹H-NMR-Spektren und ein STD-Spektrum aufgezeichnet und die Titration des FDP im Anschluss fortgesetzt. Für die Auswertung wurde ein Spektrum von Glycol in *d*TBS aufgezeichnet und das Signal integriert (50 μM). Das Integral wurde auf die jeweilige aus der Titration resultierende Verdünnung zurückgerechnet. Für das Farnesyldiphosphat wurde das Signal der Methylgruppe H-12 integriert, aus dem Vergleich

der Integrale ergibt sich dann die Konzentration des „detektierbaren“ FDP. Abbildung 33 verdeutlicht das Verhalten von FDP in wässriger Lösung und in Gegenwart der Magnesiumionen.

Tabelle 6: Titrationstabelle für die Artefaktmessung von FDP gegen Glycol in *d*TBS. Für die Zuordnung der Protonenresonanzen vgl. Abbildung 26, S. 51. Die Intensitäten sind in Prozent angegeben.

| Zugabe FDP [μ l] | $c(\text{FDP})$ - soll [μ M] | $c(\text{MgCl}_2)$ [mM] | $c(\text{FDP})$ - NMR [μ M] | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|-----------------------|-----------------------------------|-------------------------|----------------------------------|------|------|------|------|
| 1.1 | 13.7 | 0.1 | 8.1 | – | – | – | – |
| 1.1 | 27.2 | 0.1 | 27.1 | – | – | – | – |
| 1.1 | 40.6 | 0.1 | 42.1 | – | – | – | – |
| 1.1 | 53.8 | 0.1 | 59.9 | – | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 1.1 | 66.9 | 0.1 | 75.9 | – | 0.4 | 0.4 | – |
| – | 66.3 | 0.2 | 73.3 | 0.3 | 0.4 | 0.4 | – |
| 1.1 | 79.1 | 0.2 | 81.5 | 0.4 | 0.4 | 0.5 | 0.4 |
| 1.1 | 91.8 | 0.2 | 88.4 | 0.3 | 0.5 | 0.5 | 0.3 |
| 1.1 | 104.4 | 0.2 | 95.9 | 0.3 | 0.5 | 0.6 | 0.3 |
| 4.4 | 153.3 | 0.2 | 130.1 | 0.5 | 0.5 | 0.6 | 0.4 |

Bis zu einer Konzentration von 67 μ M steigt die Konzentration proportional an und entspricht der theoretischen Konzentration (Sollkonzentration). Durch die Erhöhung der Magnesiumkonzentration auf 0.2 mM verringert sich die detektierbare Menge an FDP. Bei Fortführung der Titration liegt die gemessene FDP-Konzentration in geringem Maß unter der Sollkonzentration. Bei der höchsten Konzentration von 153.3 μ M beträgt der Unterschied zwischen detektierter Menge FDP und dem berechneten Wert 20%. Der Verlauf der detektierbaren FDP-Konzentration deckt sich mit den gemessenen Artefakten in den STD Spektren (Tabelle 6). Artefaktssignale sind fast ausschließlich für die Methylgruppen zu beobachten, erst bei der höchsten Konzentration zeigen auch andere Signale Artefakte. Erstmals treten Artefaktssignale eindeutig ab einer FDP-Konzentration von 54 μ M auf. Schwankungen innerhalb der Messreihen sind darauf zurückzuführen, dass die Signale im STD-Spektrum nur sehr geringe Intensitäten aufweisen ($S/N \sim 3$ für die Methylgruppen). Die Artefakte nehmen aber eindeutig konzentrationsabhängig zu. Den Messdaten zufolge beginnt

die Aggregation in Gegenwart des Magnesiums ab einer FDP-Konzentration von ca. 60 μM . Für die CMC von FDP in Wasser bzw. D_2O wird ein Wert von 12 mM berichtet.⁹⁸

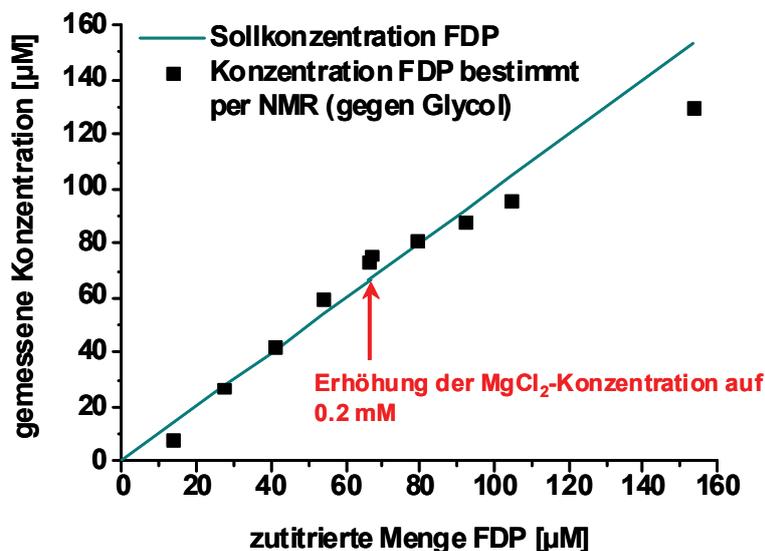


Abbildung 33: Verlauf des Integrals der H-12 Protonen von Farnesyldiphosphat bei Titration zu δTBS . Die Sollkonzentration wurde gegen 50 μM Glycol als internen Standard bestimmt. Bis zu einer Konzentration von 67 μM FDP steigt die gemessene Konzentration mit der Sollkonzentration an. Bei weiterer Erhöhung der FDP-Konzentration wird aufgrund von Micellbildung ein nicht proportionaler Anstieg der NMR-Signale detektiert.

Eine konventionelle Methode das Aggregationsverhalten amphiphiler Verbindungen und die Bildung von Micellen mittels NMR zu untersuchen besteht darin, die chemische Verschiebung der Protonensignale als Funktion der Konzentration aufzuzeichnen.^{57;60;62} Durch die Assoziation der Amphiphile ändert sich die Umgebung der individuellen Protonen. Bei schnellem Austausch mitteln sich die per NMR beobachtbaren Parameter wie die chemische Verschiebung oder die Relaxationszeiten entsprechend den Populationen der Moleküle im assoziierten oder im freien Zustand. Bis zum Einsetzen der Assoziation bleiben diese Werte also konstant. Mit steigender Konzentration tritt eine Änderung des beobachteten Parameters ein, der in der Folge ein Maximum bzw. Minimum anstrebt. Dieser Wert entspricht dem Parameter in der veränderten chemischen Umgebung. Abbildung 34 zeigt die chemischen Verschiebungen der Methylprotonen H-13 und H-14 sowie der H-1 Protonen von FDP für die in Tabelle 6 beschriebene Titration. Die maximale Änderung $\Delta\delta$ zwischen der niedrigsten und der höchsten Konzentration beträgt 0.003 ppm für die Methylgruppen und 0.004 ppm für die H-1 Protonen. Die chemischen Verschiebungen der Methylgruppen bleiben bis zu einer Konzentration von 50 μM konstant und erfahren zwischen 50 und 100 μM eine deutliche Tieffeldverschiebung. Zwischen 100 und 150 μM FDP bleibt der Wert relativ

konstant. Die Erhöhung der MgCl_2 -Konzentration von 100 auf 200 μM wirkt sich kaum auf die chemischen Verschiebungen auf. Der Verlauf der Kurve für die H-1 Methylengruppe ist weniger gut definiert, ähnelt aber denen der Methylgruppen. Allerdings wirkt sich hier die Erhöhung der Magnesiumkonzentration deutlich stärker aus. Diese bewirkt eine Tieffeldverschiebung von 0.001 ppm, was durch die α -Stellung zu der magnesiumkoordinierenden Diphosphatgruppe zu erklären sein dürfte.

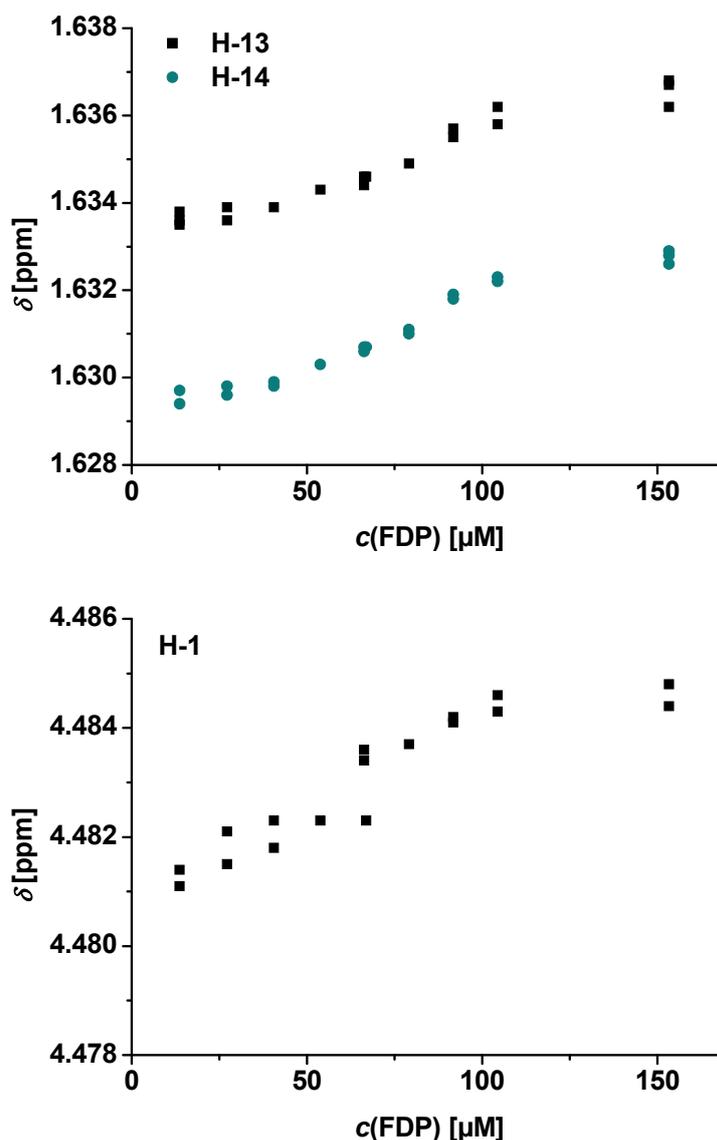


Abbildung 34: Änderungen in den ^1H -Verschiebungen aufgrund der Micellbildung für Signale der Methylgruppen H-13 und H-14 (oben) und die H-1 Methylengruppe (unten) mit steigender FDP-Konzentration.

Die Bestimmung der CMC kann durch Auftragung der chemischen Verschiebung gegen die reziproke Konzentration erfolgen, wobei man zwei lineare Abschnitte erhält (Abbildung 35). Für kleine Konzentration ist der Verlauf parallel zur Abszisse, bei Erreichen der CMC ändert

sich die chemische Verschiebung linear mit $1/c$ entsprechend der Gleichung 14.⁵⁹ Abweichungen lassen sich auf das mit Gleichung 14 beschriebene idealisierte Verhalten unter Vernachlässigung einer Aggregation vor der CMC zurückführen. Für das FDP ergibt sich somit bei einer MgCl_2 -Konzentration von $200 \mu\text{M}$ eine CMC von etwa $50 \mu\text{M}$, was um einen Faktor von 240 niedriger ist als der für Wasser angegebene Wert.

$$\delta = \delta_m + \frac{\text{CMC}}{c_{\text{Amph.}}}(\delta_f - \delta_m)$$

Gleichung 14: Abhängigkeit für die Änderung der chemischen Verschiebung mit $1/c_{\text{Amph.}}$. δ : chemische Verschiebung; δ_m : chemische Verschiebung im Micellverband; δ_f : chemische Verschiebung der Monomere.

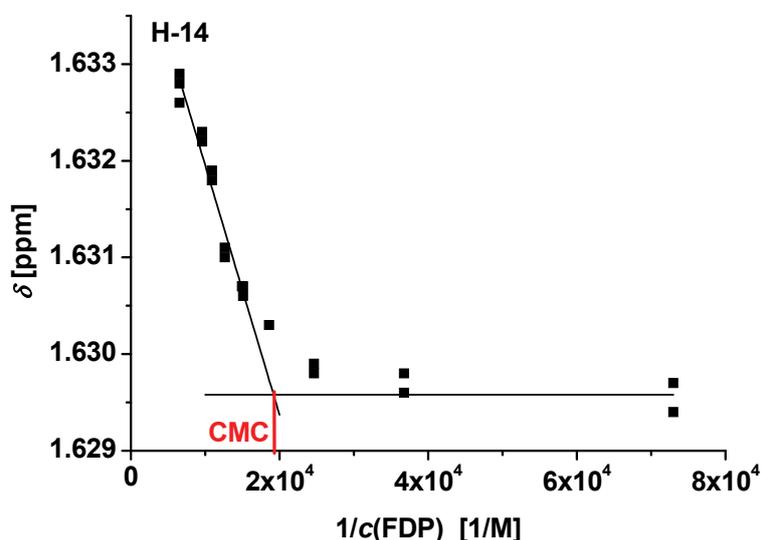


Abbildung 35: Bestimmung der CMC aus den chemischen Verschiebungen der H-14 Methylprotonen von FDP (graphisch).

Um zu überprüfen, ob die Veränderung des Löslichkeitsverhaltens auf die Erhöhung der MgCl_2 -Konzentration von 0.1 auf 0.2 mM zurückzuführen ist, wurde das Titrationsexperiment wiederholt. Die Zugabe des Farnesyldiphosphats erfolgte nach Tabelle 7 und wurde gegen $d\text{TBS}$ ohne, mit 0.1 und mit 0.2 mM MgCl_2 durchgeführt (Abbildung 36). Wie man in der Grafik erkennen kann, steigen die Konzentrationen bei allen drei Titrationen zunächst gleich schnell an. Ab einer Konzentration von $50 \mu\text{M}$ FDP wird in beiden magnesiumhaltigen Puffern eine verringerte Detektierbarkeit des FDP festgestellt. Der Unterschied zwischen der 0.1 und der 0.2 mM Lösung fällt nur gering aus und liegt innerhalb

des Messfehlers. In *d*TBS ohne MgCl₂-Zusatz steigt die per NMR bestimmte FDP-Konzentration auch über die 60 μM hinaus parallel mit der Sollkonzentration an.

Tabelle 7: Titrationstabelle für die Artefaktmessung von FDP gegen Imidazol in *d*TBS.

| | | | | | | |
|--------------------|------|------|------|------|-------|-------|
| Zugabe FDP [μl] | 1.1 | 1.1 | 2.2 | 2.2 | 2.2 | 4.4 |
| c(FDP) - soll [μM] | 13.7 | 27.2 | 53.8 | 79.9 | 105.4 | 154.8 |

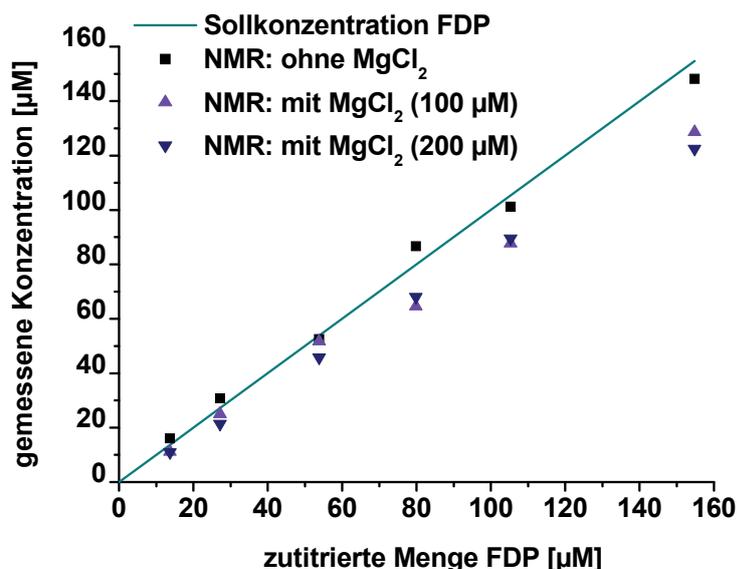


Abbildung 36: Wiederholung des Experiments aus Abbildung 33, wobei die Zugabe an Farnesyldiphosphat gegen *d*TBS ohne, mit 100 und mit 200 μM MgCl₂ erfolgte. Ohne MgCl₂ steigt die gemessene Konzentration bis zur höchsten Zugabe von FDP proportional zur Sollkonzentration an. Eine Verringerung der Signalintensitäten tritt nur in Gegenwart des Magnesiums auf. Für beide MgCl₂-Konzentrationen (100 und 200 μM) ist der Effekt etwa gleich groß.

Tabelle 8: Vergleich der Integrale aus den FDP-Spektren in *d*TBS bei verschiedenen MgCl₂-Konzentrationen. Die Integration erfolgte über die gesamte Spektrenbreite (11160.714 Hz).

| | <i>d</i> TBS kein MgCl ₂ | <i>d</i> TBS 0.1 mM MgCl ₂ | <i>d</i> TBS 0.2 mM MgCl ₂ |
|---|--|--|--|
| Integration über das gesamte Spektrum | 4.75×10^{10} | 4.84×10^{10} | 4.45×10^{10} |
| in % bezogen auf <i>d</i> TBS, kein MgCl ₂ | 100 | 102 | 94 |

Für die Spektren in Abbildung 31 wurde bei Integration über die gesamte Spektrenbreite eine Reduktion der Signalintensität für (b) gegenüber (a) von 33% beobachtet. Im Vergleich dazu werden für die drei hier untersuchten Proben bei der höchsten FDP-Konzentration (154.8 μM) etwa die gleichen absoluten Integrale über die gesamte Spektrenbreite verzeichnet (Tabelle 8). Die FDP- und MgCl_2 -Konzentrationen haben somit einen Einfluss auf die Größe der sich bildenden Aggregate. Aufgrund der geringeren Größe der Micellen haben diese längere T_2 -Zeiten, wodurch die Linienverbreiterung geringer ausfällt. Letztlich spiegelt sich das in einer deutlichen Verringerung der STD-Signale bei den Artefaktmessungen wider.

Um die Artefaktmessungen mit den Sättigungsexperimenten an der (+)-Germacren D Synthase abzugleichen, wurden die verschiedenen Parameter für die Einstrahlfrequenz und die Sättigungsleistung getestet. Als Einstrahlpunkte wurden der Bereich zwischen -1 und -2 ppm, sowie der aromatische Bereich um 7.5 ppm getestet. Für die Einstrahlpunkte von -1 und 7.5 ppm zeigten die STD-Differenzspektren von FDP vergleichbare Signalintensitäten, die Werte lagen aber in einem akzeptablen Bereich. Eine Einstrahlung des Sättigungspulses bei -1.5 ppm führte kaum zu Änderungen in den Artefaktintensitäten. Eine Einstrahlung bei -2 ppm und 25 dB Leistung reduzierte die Artefakte gegenüber einer Einstrahlung bei -1 ppm und 25 dB um rund ein Drittel. Allerdings wurde bei -2 ppm keine zufrieden stellende Proteinsättigung erreicht. Insgesamt führt eine Einstrahlleistung von 25 dB zu einem unverhältnismäßig hohen Anstieg der Artefakte (Abbildung 37). Ein Wert von 35 dB hat sich deshalb als gut vereinbar mit den Ligandeigenschaften ergeben.

Weiterhin musste überprüft werden, ob und wie sich der Zusatz von DMSO in dem Messpuffer auf die Artefaktmessungen auswirkt. Abbildung 38 zeigt zwei Spektren einer 100 μM FDP-Lösung in $d\text{TBS}$ mit 0.1 mM MgCl_2 . Für das Spektrum in (b) wurde der Lösung 2% $\text{DMSO-}d_6$ zugefügt. Gegenüber der Messung aus (a) steigen die Artefaktssignale etwa um das Vierfache an. Eine Zusammenstellung der Experimente mit den Daten aus den STD-Spektren findet sich im Experimentellen Teil (ab S. 162).

Als Bedingung für STD-Experimente mit der (+)-Germacren D Synthase und dem FDP wurden zusammenfassend folgende Messparameter als geeignet gewählt: Die Einstrahlung des Sättigungspulses erfolgt bei 7.5 ppm mit einer Leistung von 35 dB und einer Sättigungszeit von 2 s. Abschließend wurden noch einmal die STD-Intensitäten für das FDP ohne Protein mit diesen Messparametern bestimmt. Es wurden vier 154.8 μM FDP-Lösungen mit unterschiedlichen MgCl_2 -Konzentrationen angesetzt (Tabelle 9).

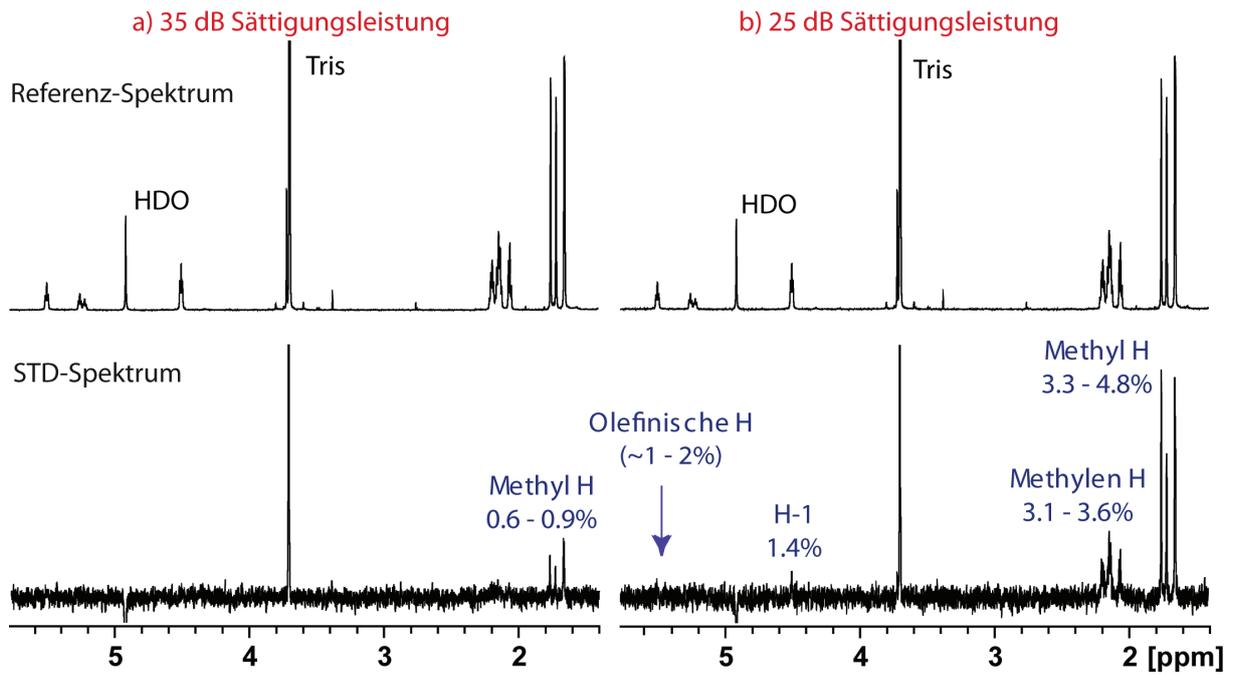


Abbildung 37: Vergleich der STD-Artefakte bei verschiedenen Sättigungsleistungen und gleichem Einstrahlpunkt (-1 ppm, 700 MHz). Die Erhöhung der Sättigungsleistung um 10 dB führt zu einer Erhöhung der Artefaktsignale um den Faktor fünf. Aufnahmeparameter: Tabelle 62 und 62, S. 165.

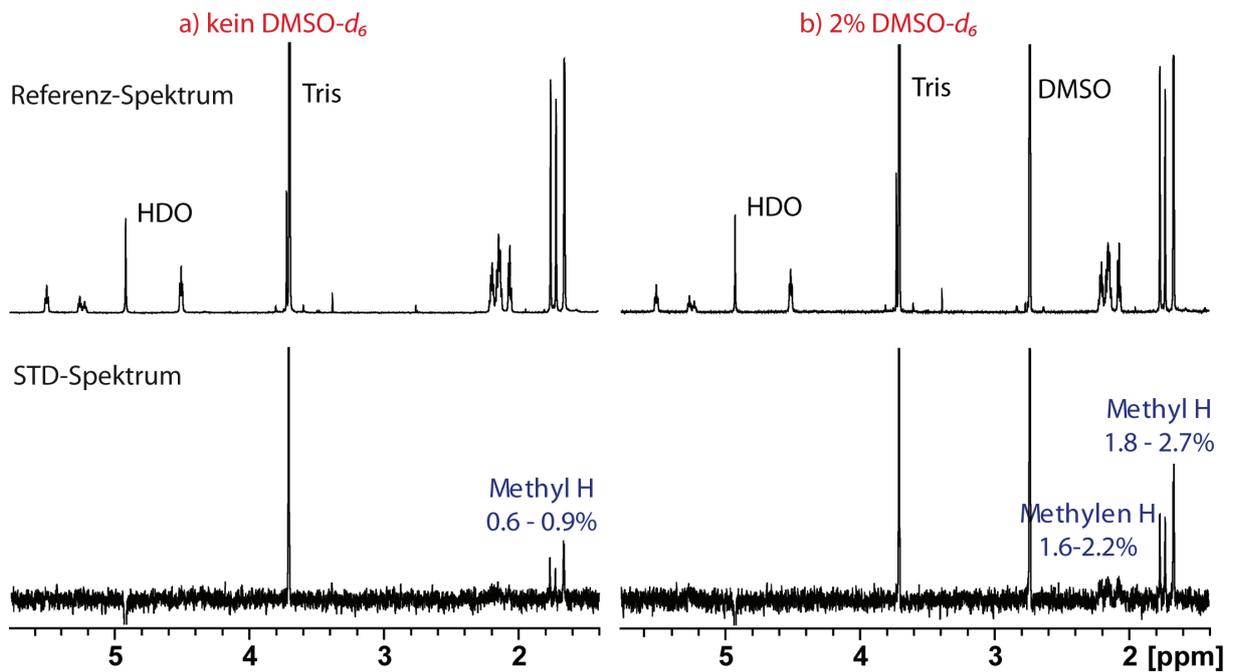


Abbildung 38: Vergleich zweier STD-Artefaktmessungen (700 MHz) bei gleicher FDP-Konzentration mit und ohne Zusatz von 2% DMSO- d_6 . Die Zugabe erhöht die Intensitäten der STD-Signale im Differenzspektrum, die Tendenz der Micellbildung scheint also verstärkt zu werden. Aufnahmeparameter: Tabelle 62 und 63, S. 165.

Tabelle 9: Abschließende Artefaktmessung für das FDP bei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen unter den vorevaluierten Messbedingungen für die STD-Experimente am 700 MHz Spektrometer. Die Intensitäten sind in Prozent angegeben.

| $c(\text{MgCl}_2)$ [mM] | $c(\text{FDP})$ [μM] | H-1 | H-2 | H-4/ H-9 | H-5 | H-6 | H-8 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|----------------------------|--------------------------------------|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| 0.1 | 154.8 | – | – | – | – | – | – | – | 0.3 | 0.5 | 1.2 | 0.2 |
| 0.2 | 154.8 | – | – | – | – | – | – | – | 0.8 | 0.5 | 0.7 | 0.3 |
| 0.5 | 154.8 | 0.3 | – | 1.0 | 0.9 | – | 0.9 | – | 1.0 | 1.2 | 1.8 | 1.1 |
| 1.0 | 154.8 | 0.9 | – | 0.9 | 1.5 | – | 1.0 | – | 1.7 | 2.2 | 2.2 | 1.8 |

Anhand der in diesem Kapitel beschriebenen Experimente konnten einige wichtige Erkenntnisse über das Löslichkeitsverhalten von Farnesyldiphosphat in wässrigen Lösungen erhalten werden. Diese ergänzen frühere, bereits in der Literatur beschriebene Ergebnisse. Zahn *et al.* haben NMR-spektroskopische Untersuchungen an einigen *bis*-¹³C markierten FDP- und GGDP-Molekülen in verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt, die gezeigt haben, dass die Prenyldiphosphate sowohl in polaren als auch in apolaren Lösungen eine gestreckte Konformation bevorzugen.⁹⁸ Vor allem für Lösungen in D₂O war das Ergebnis überraschend, da angenommen wurde, dass FDP in einer gefalteten Konformation vorliegen würde, um so intramolekular die Kontaktfläche zu den Lösungsmittelmolekülen zu verringern. Ein solches Verhalten steht im Einklang mit dem hydrophoben Effekt und konnte für verschiedene organische Verbindungen aufgezeigt werden.⁹⁹⁻¹⁰¹ Scheinbar reicht diese Art einer intramolekularen Aggregation aber nicht aus, um den Energieverlust durch die weniger bevorzugte, gefaltete Konformation zu kompensieren. Die Autoren beschreiben auch, dass in ihren Spektren mit FDP-Konzentrationen bis zu 10 mM keine Hinweise auf intermolekulare Aggregation oder Micellbildung festzustellen waren.

Letztere Beobachtung deckt sich durchaus mit den Ergebnissen der hier durchgeführten Experimente. Sowohl in D₂O als auch in *d*TBS wurden Spektren mit guter Dispersion erhalten, die zunächst keinen Hinweis auf Aggregation geben. Artefaktssignale in den STD-Spektren treten nur in sehr geringem Maße auf. Die hier untersuchten Konzentrationen liegen aber auch um einen Faktor 20 niedriger als die bei den von Zahn *et al.* durchgeführten Experimenten. Es ist sicherlich zu erwarten, dass die hohe NaCl-Konzentration (0.3 M) in dem verwendeten Tris-Puffer die CMC von FDP etwas herabsetzt. Eine wirklich spürbare Veränderung im Löslichkeitsverhalten resultiert allerdings aus der Zugabe der

Magnesiumionen. Bereits geringe Mengen an MgCl_2 unterhalb von 1 mM bewirken ein deutlich ausgeprägtes Aggregationsverhalten. Dies äußert sich zum einen in der Reduktion der Signalintensitäten, einer konzentrationsabhängigen Änderung der chemischen Verschiebungen sowie zum anderen in dem verstärkten Auftreten von STD-Artefakten. Der Effekt nimmt sowohl mit steigender FDP- als auch mit steigenden Mg^{2+} -Konzentration zu. Das spricht für eine intermolekulare Vermittlung der Aggregation unter Beteiligung der Magnesiumionen. DMSO verstärkt diesen Effekt zusätzlich.

4.2.4 Löslichkeitsverhalten von Farnesylmonophosphat

Im Fall des Farnesylmonophosphats wurde prinzipiell von einem ähnlichen Löslichkeitsverhalten wie für das Diphosphat ausgegangen. In Wasser sollte aufgrund des Fehlens von einer Phosphatgruppe und somit auch von einer negativen Ladung die CMC etwas niedriger liegen als für das FDP. Auf der anderen Seite wird sich eine steigende Elektrolytstärke in einem Puffer stärker auf die CMC von FDP als von FMP auswirken. Im Besonderen wurde für das Magnesium ein stärkerer Effekt auf das Aggregationsverhalten von FDP als für das FMP erwartet. Diese Annahmen konnten leicht experimentell bestätigt werden. Im Gegensatz zum FDP wurde keine Präzipitation von Micellen beobachtet. Auch eine Konzentration von 10 mM MgCl_2 und 500 μM FMP hatte keinen sichtbaren Effekt auf die Löslichkeit. Insgesamt fielen die STD-Signale in den Artefaktspektren bei gleichen Messbedingungen und gleichen Ligand- und Magnesiumkonzentrationen geringer aus.

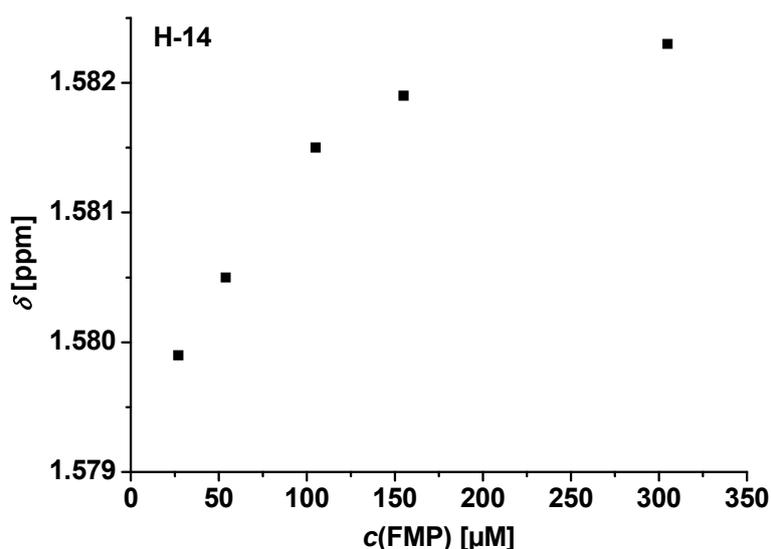


Abbildung 39: Änderungen in den ^1H -Verschiebungen aufgrund der Micellbildung für das Signal der Methylgruppe H-14 mit steigender FMP-Konzentration.

Abbildung 39 zeigt die Änderung der chemischen Verschiebung der H-14 Protonen bei zunehmender FMP-Konzentration in *d*TBS mit 1 mM MgCl₂. Im Vergleich zu den Experimenten an FDP wurden weniger Datenpunkte aufgezeichnet. Deshalb ist im unteren Konzentrationsbereich nicht zu erkennen, ab welcher Konzentration die Änderung eintritt. Der Unterschied $\Delta\delta$ zwischen der niedrigsten und der höchsten Konzentration, der bei 0.003 ppm liegt, ist mit dem Wert der Micellbildung von FDP vergleichbar. Insgesamt vollzieht sich die Änderung deutlich langsamer und das zweite Plateau wird bei einer Konzentration von 300 μ M erreicht. Dieser Wert liegt doppelt so hoch wie beim FDP und zeigt den verminderten Einfluss der Magnesiumionen auf die Micellbildung. Die Auftragung der Änderung der chemischen Verschiebung gegen die reziproke FMP-Konzentration lässt eine Abschätzung der CMC zu. Diese liegt bei 45 μ M, also ein wenig niedriger als beim FDP. Allerdings ist der Wert aufgrund der geringen Anzahl von Datenpunkten mit einem hohen experimentellen Fehler belegt.

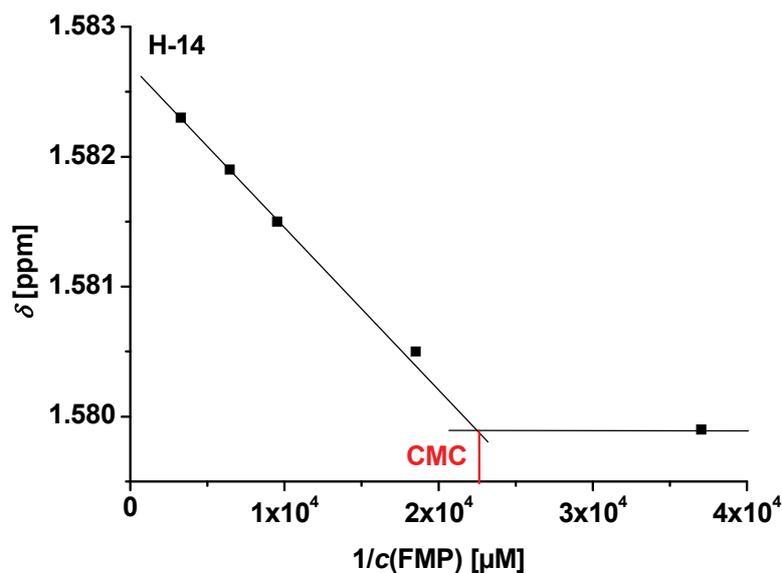


Abbildung 40: Bestimmung der CMC von FMP aus den chemischen Verschiebungen der H-14 Methylprotonen (graphisch).

Für die Bestimmung von Artefaktsignalen in STD-Spektren aufgrund der Micellbildung wurden die bereits ermittelte Parameter für die Sättigungsleistung und -dauer sowie den Einstrahlpunkt zugrunde gelegt (35 dB, 2 s, 7.5 ppm). Die Messungen wurden für Magnesiumkonzentrationen von 1 mM und von 10 mM in *d*TBS durchgeführt. FMP wurde dem jeweiligen Puffer zutitriert. Wie schon die Experimente mit dem FDP gezeigt haben, ist eine Bestimmung der STD-Intensitäten bei niedrigen Ligandkonzentrationen aufgrund der

schlechten *S/N*-Verhältnisse mit großen Fehlern behaftet. Für die Messungen in *d*TBS und 10 mM Magnesium wurde eine lineare Abhängigkeit der STD-Intensitäten von der FMP-Konzentration zwischen 100 und 500 μM festgestellt (Abbildung 41). Bei Konzentrationen unter 100 μM führte die Bestimmung zu großen Abweichungen. Aufgrund dieser Schwankungen wurde für den Bereich der linearen Abhängigkeit eine Regression durchgeführt und die STD-Artefakte aus der Steigung der Regressionsgeraden errechnet. Obwohl die CMC von FMP bei 50 μM liegt und Artefaktssignale unterhalb dieser Konzentration wahrscheinlich keine Rolle spielen, wurde der Ursprung als Achsenabschnitt für die Regressionsgerade gewählt. Die Errechnung von theoretischen STD-Intensitäten dient der Abschätzung experimentell schwer bestimmbarer Größen. Die Tabellen 10 und 11 fassen die Ergebnisse der Berechnung für beide Messreihen zusammen. Wie beim FDP wurden die höchsten Artefaktssignale für die Methylgruppen und die Olefinprotonen erhalten. Die STD-Intensitäten der Methylenprotonen fielen um ca. ein Drittel geringer aus. Bei einer Konzentration von 154.8 μM FMP wurden Intensitäten ermittelt, die mit dem FDP bei einer um den Faktor 10 geringeren Magnesiumkonzentration erhalten wurden.

Tabelle 10: Bestimmung der Artefaktintensitäten für das Farnesylmonophosphat durch graphische Extrapolation, entsprechend der Abbildung 41 (*d*TBS, 10 mM MgCl_2). Die Intensitäten sind in Prozent angegeben.

| <i>c</i> (FMP) [μM] | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| 27.2 | 0.2 | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.4 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.3 |
| 53.8 | 0.5 | 0.9 | 0.4 | 0.3 | 0.8 | 0.5 | 0.5 | 0.7 | 0.6 | 0.7 | 0.9 | 0.6 |
| 105.4 | 1.0 | 1.7 | 0.9 | 0.7 | 1.6 | 1.0 | 0.9 | 1.4 | 1.3 | 1.5 | 1.8 | 1.2 |
| 123.5 | 1.1 | 2.0 | 1.0 | 0.8 | 1.9 | 1.2 | 1.1 | 1.7 | 1.5 | 1.7 | 2.1 | 1.4 |
| 154.8 | 1.4 | 2.5 | 1.3 | 1.0 | 2.4 | 1.5 | 1.4 | 2.1 | 1.9 | 2.2 | 2.6 | 1.7 |
| 243.9 | 2.2 | 4.0 | 2.0 | 1.5 | 3.7 | 2.3 | 2.1 | 3.4 | 2.9 | 3.4 | 4.2 | 2.7 |
| 304.8 | 2.8 | 5.0 | 2.5 | 1.9 | 4.7 | 2.9 | 2.7 | 4.2 | 3.7 | 4.2 | 5.2 | 3.4 |
| 476.2 | 4.3 | 7.7 | 3.9 | 3.0 | 7.3 | 4.5 | 4.2 | 6.5 | 5.7 | 6.6 | 8.1 | 5.3 |

Reduziert man die Magnesiumkonzentration für das FMP um den Faktor 10 reduzieren sich die STD-Intensitäten um 30-40% (Tabelle 11). Die Daten müssen etwas vorsichtiger interpretiert werden, da nur zwei wirkliche Messpunkte für die Regression zur Verfügung standen. Vor allem für das Olefinproton H-10 liegt der berechnete Wert zu hoch.

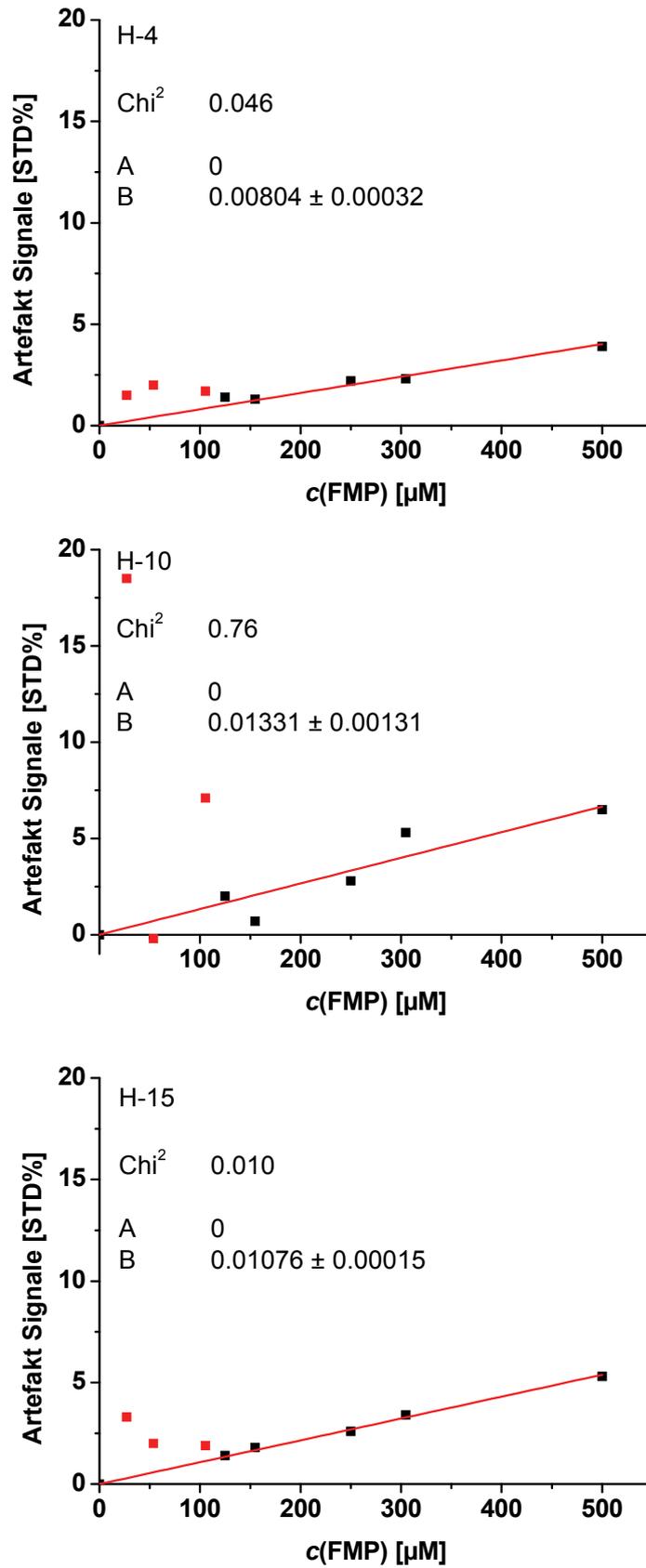


Abbildung 41: Graphische Extrapolation der Artefaktsignale für das FMP durch den Ursprung aufgrund der hohen Abweichungen im unteren Konzentrationsbereich (*d*TBS, 10 mM MgCl₂).

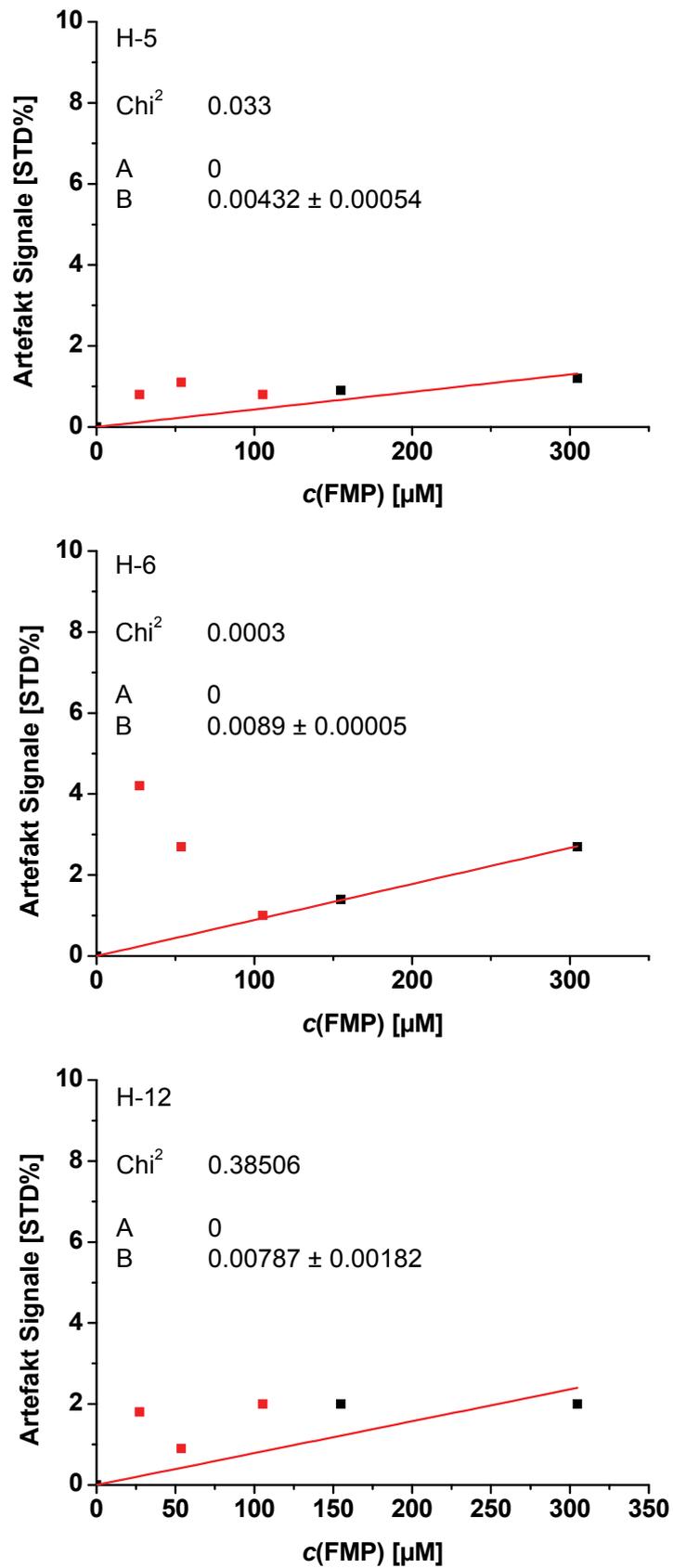


Abbildung 42: Graphische Extrapolation der Artefaktssignale für das FMP durch den Ursprung aufgrund der hohen Abweichungen im unteren Konzentrationsbereich (*d*TBS, 1 mM MgCl₂).

Tabelle 11: Bestimmung der Artefaktintensitäten für das Farnesylmonophosphat durch graphische Extrapolation, entsprechend der Abbildung 42 ($dTBS$, 1 mM $MgCl_2$). Die Intensitäten sind in Prozent angegeben.

| $c(FMP)$ [μM] | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| 27.2 | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.3 | 0.2 |
| 53.8 | 0.2 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.5 | 0.3 | 0.3 | 0.8 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.4 |
| 105.4 | 0.4 | 0.9 | 0.6 | 0.5 | 0.9 | 0.5 | 0.6 | 1.5 | 0.8 | 0.9 | 1.2 | 0.8 |
| 154.8 | 0.6 | 1.3 | 0.9 | 0.7 | 1.4 | 0.8 | 0.9 | 2.2 | 1.2 | 1.4 | 1.7 | 1.1 |
| 304.8 | 1.2 | 2.5 | 1.8 | 1.3 | 2.7 | 1.5 | 1.7 | 4.4 | 2.4 | 2.7 | 3.4 | 2.2 |

4.3 T_1 -Relaxationsmessungen

Die Relaxationszeiten T_1 und T_2 hängen im Wesentlichen von der Beweglichkeit der Moleküle ab. Dies gilt im Besonderen für die transversale Relaxationszeit T_2 , die sich umgekehrt proportional zur Molekülmasse verhält. Dagegen durchläuft die longitudinale Relaxationszeit T_1 ein Minimum bei $\omega_0\tau_c \sim 1$ (vgl. Abschnitt 2.1.2., S. 25). Für das STD-Experiment spielen die Relaxationszeiten eine wesentliche Rolle. Für einen effektiven Sättigungstransfer vom Protein auf den Liganden sind dessen kurzen T_2 -Relaxationszeiten im gebundenen Zustand verantwortlich. Nach der Dissoziation des Liganden wird die Sättigung in Lösung mit T_1 abgebaut. Große Differenzen in den T_1 -Relaxationszeiten der Protonen des Liganden können zu Verfälschungen des Bindungsepitops führen. Deshalb wurden von den drei Liganden FDP, FMP und (+)-GD die T_1 -Relaxationszeiten bestimmt. Ferner wurde für das Farnesyldiphosphat der Einfluss der Magnesiumkonzentration auf T_1 untersucht. Für das (+)-GD wurden die T_1 -Zeiten bei unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen vermessen.

Die Bestimmung von T_1 erfolgt über das *inversion recovery* Experiment (Pulsprogramm: *t1ir*). Da das Standardexperiment keine Wasserunterdrückung vorsieht, wurde die *excitation sculpting* Sequenz in die *t1ir*-Sequenz eingebaut (Pulsprogramm: *t1iresgp.th*, vgl. Anhang S. 194).⁶⁶ Abbildung 43 zeigt einen *stacked plot* der Spektren aus dem *inversion recovery* Experiment mit Wasserunterdrückung. Die Nulldurchgänge der einzelnen Protonen liegen bei Relaxationsdelays von 0.25-2 s. Mit einem Delay von 10 s wurden alle Signalintensitäten vollständig regeneriert. Durch Auftragen der Signalintensitäten gegen die Relaxationsdelays

und *fit* nach Gleichung 5 konnten die T_1 -Zeiten für alle Protonen in allen Lösemittelsystemen bestimmt werden (Tabelle 12). Abbildung 44 zeigt beispielhaft drei Regressionskurven.

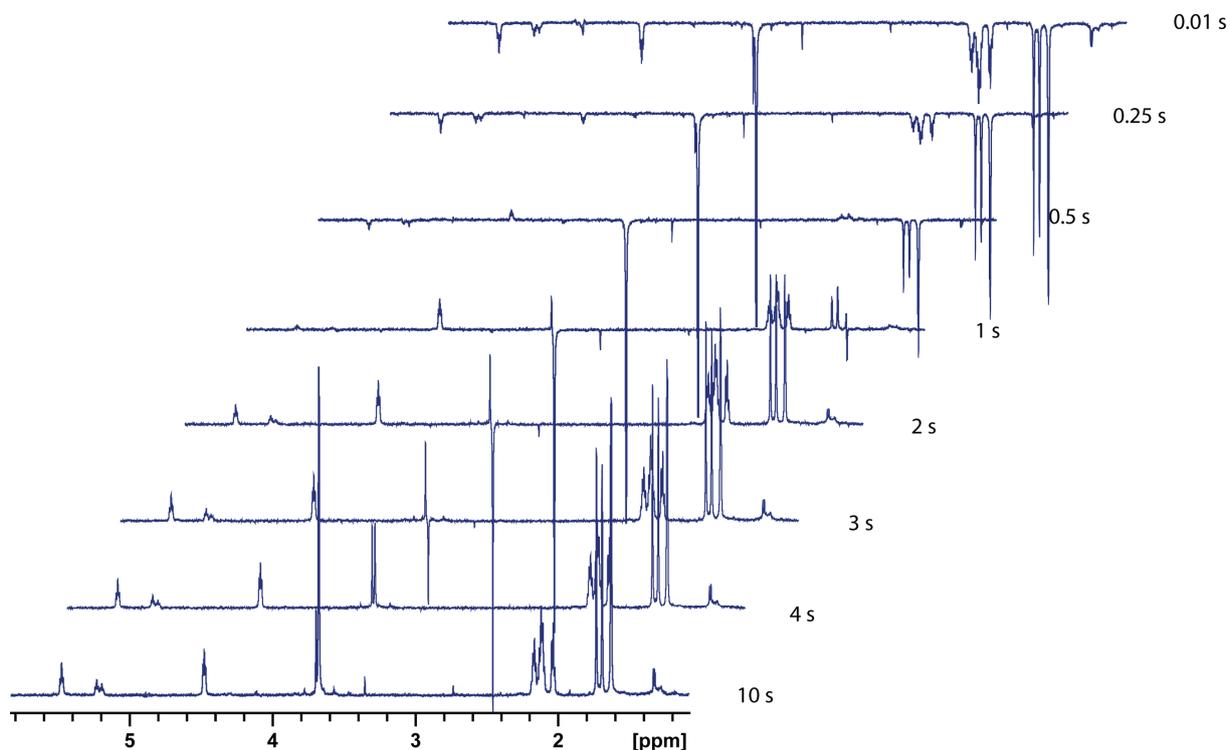


Abbildung 43: *Stacked plot* für das *inversion recovery* Experiment an FDP in *dTBS* (0.2 mM MgCl_2). Rechts neben dem Spektrum ist der jeweilige verwendete Relaxationsdelay (τ) angezeigt. Nach 10 s sind die Intensitäten aller Signale vollständig wiederhergestellt. Die Nulldurchgänge der einzelnen Protonen liegen bei Relaxationsdelays von 0.25-2.00 s.

Die T_1 -Zeiten liegen für die Methylengruppen zwischen 0.5 und 0.7 s, für die Olefin- und Methylprotonen zwischen 1.2 und 2.1 s und sind in der gleichen Größenordnung, wie man sie für andere organische Verbindungen findet.¹⁰² Etwas unerwartet ist die Tatsache, dass sich die T_1 -Zeiten in den unterschiedlichen Puffersystemen nicht sehr unterscheiden. In D_2O wurden im Mittel geringfügig längere T_1 -Zeiten bestimmt als in den *dTBS* Systemen. Das betrifft vor allem die H-1 und H-2 Protonen in α - und β -Stellung zur Diphosphatgruppe. Die hohe Ionenstärke des Puffers scheint die Beweglichkeit der geladenen Kopfgruppe zu beeinflussen. Für H-10 und H-14 wurden in dem magnesiumfreien *dTBS* etwas verkürzte Relaxationszeiten gegenüber den magnesiumhaltigen Tris-Puffern und dem D_2O ermittelt. Dafür korrelieren die Intensitäten der Artefaktsignale mit den Relaxationszeiten. Das ist konsistent mit einem ungerichteten Bindungsprozess bei der Aggregation zu den Micellverbänden. Alle Protonen erfahren somit im Mittel dieselbe Sättigung. Da die Sättigung in Lösung mit T_1 abgebaut wird, sind die Artefaktintensitäten durch die longitudinale Relaxation moduliert.

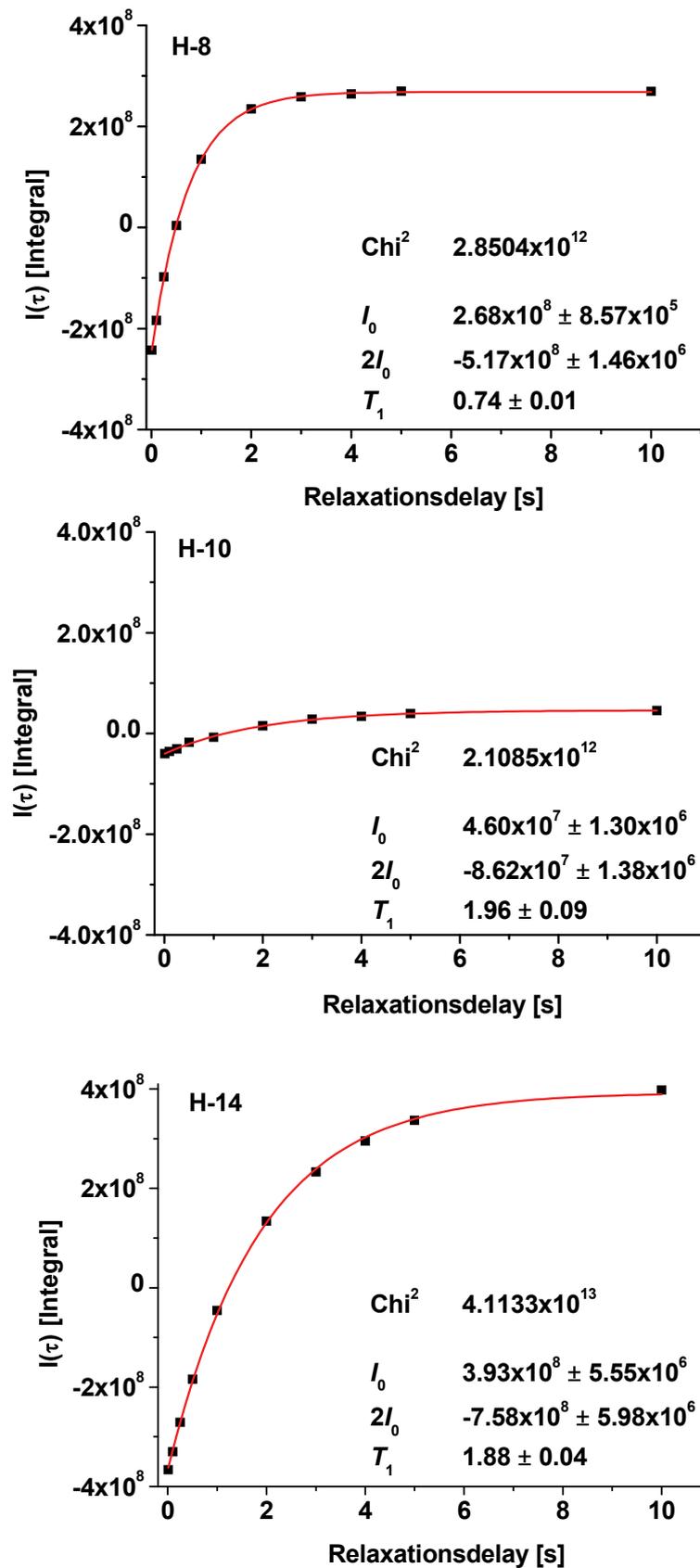


Abbildung 44: Bestimmung der T_1 -Relaxationszeiten nach Gleichung 5 für die Protonensignale von H-8, H-10 und H-14 des Farnesyldiphosphats.

Tabelle 12: Relaxationszeiten von Farnesyldiphosphat in D₂O und *d*TBS mit variierenden MgCl₂-Konzentrationen [$c(\text{FDP}) = 500 \mu\text{M}$ in D₂O, $c(\text{FDP}) = 154.8 \mu\text{M}$ in *d*TBS].

| Position | T_1 in D ₂ O | T_1 in <i>d</i> TBS | T_1 in <i>d</i> TBS | T_1 in <i>d</i> TBS |
|----------|---------------------------|-----------------------|--|--|
| | [s] | [s] | 100 μM MgCl ₂ [s] | 200 μM MgCl ₂ [s] |
| H-1 | 0.68 ± 0.01 | 0.56 ± 0.00 | 0.58 ± 0.01 | 0.55 ± 0.08 |
| H-2 | 1.39 ± 0.03 | 1.19 ± 0.03 | 1.24 ± 0.02 | 1.19 ± 0.02 |
| H-4 | 0.72 ± 0.01 | 0.70 ± 0.00 | 0.71 ± 0.01 | 0.71 ± 0.00 |
| H-5 | 0.68 ± 0.01 | 0.66 ± 0.01 | 0.69 ± 0.00 | 0.69 ± 0.00 |
| H-6 | 1.35 ± 0.09 | 1.25 ± 0.03 | 1.26 ± 0.06 | 1.26 ± 0.04 |
| H-8 | 0.75 ± 0.00 | 0.71 ± 0.00 | 0.73 ± 0.01 | 0.74 ± 0.01 |
| H-9 | 0.72 ± 0.01 | 0.70 ± 0.00 | 0.71 ± 0.01 | 0.71 ± 0.00 |
| H-10 | 1.95 ± 0.10 | 1.73 ± 0.06 | 2.12 ± 0.15 | 1.96 ± 0.09 |
| H-12 | 1.32 ± 0.03 | 1.21 ± 0.02 | 1.27 ± 0.02 | 1.25 ± 0.02 |
| H-13 | 1.48 ± 0.03 | 1.41 ± 0.03 | 1.46 ± 0.04 | 1.45 ± 0.03 |
| H-14 | 1.90 ± 0.05 | 1.73 ± 0.04 | 1.86 ± 0.04 | 1.89 ± 0.04 |
| H-15 | 1.18 ± 0.02 | 1.12 ± 0.01 | 1.16 ± 0.02 | 1.16 ± 0.02 |

Tabelle 13: T_1 -Relaxationszeiten für Farnesylmonophosphat in D₂O [$c(\text{FMP}) = 500 \mu\text{M}$].

| Position | T_1 [s] |
|----------|-------------|
| H-1 | 1.18 ± 0.08 |
| H-2 | 1.41 ± 0.19 |
| H-4 | 0.69 ± 0.01 |
| H-5 | 0.76 ± 0.01 |
| H-6 | 1.05 ± 0.17 |
| H-8 | 0.79 ± 0.01 |
| H-9 | 0.66 ± 0.08 |
| H-10 | 1.62 ± 0.34 |
| H-12 | 1.38 ± 0.03 |
| H-13 | 1.58 ± 0.04 |
| H-14 | 2.07 ± 0.03 |
| H-15 | 1.30 ± 0.02 |

Abgesehen von den H-1 Protonen unterscheiden sich die ermittelten Relaxationszeiten des FMP nur geringfügig von denen des FDP (Tabelle 13). Die Bestimmung erfolgte ausschließlich in D₂O, da auch für das FMP keine Abhängigkeit der longitudinalen Relaxationszeit von der Konzentration an Magnesiumionen in dem Messpuffer zu erwarten war.

Für Germacren D wurden Relaxationsmessungen in den verschiedenen untersuchten Lösungsmittelsystemen durchgeführt. Dabei haben sich deutliche Unterschiede gezeigt. Je höher der Anteil an D₂O war, umso kürzer wurden die Relaxationszeiten. Der Unterschied lässt sich auf den Effekt der hydrophoben Hydratation zurückführen. Mit sinkendem Anteil an DMSO-*d*₆ wird die Größe der aus Wassermolekülen bestehenden Käfigstrukturen zunehmen, die sich um die gelösten Germacren D Moleküle bilden. Daraus resultiert eine deutliche Zunahme der Korrelationszeit.

Tabelle 14: T_1 -Relaxationszeiten für Germacren D in DMSO-*d*₆ ($c = 15$ mM, $T = 300$ K) und D₂O/DMSO-*d*₆ ($c = 0.44$ mM, $T = 300$ K).

| Position | T_1 [s] | T_1 [s] | T_1 [s] |
|---------------------|--------------------------------|--|---|
| | (DMSO- <i>d</i> ₆) | (D ₂ O/DMSO- <i>d</i> ₆ 85:15) | (D ₂ O/DMSO- <i>d</i> ₆ 95:5) |
| H-1 | 1.74 ± 0.10 | – | – |
| H-2 _(si) | 0.67 ± 0.12 | 0.62 ± 0.02 | 0.43 ± 0.03 |
| H-2 _(re) | 0.73 ± 0.05 | 0.51 ± 0.02 | 0.31 ± 0.02 |
| H-3 _(si) | 1.06 ± 0.19 | 0.62 ± 0.02 | 0.35 ± 0.03 |
| H-3 _(re) | 0.64 ± 0.05 | 0.51 ± 0.02 | 0.31 ± 0.02 |
| H-5 | 1.93 ± 0.15 | 0.90 ± 0.04 | 0.59 ± 0.59 |
| H-6 | 1.54 ± 0.06 | – | – |
| H-7 | 0.96 ± 0.06 | 0.51 ± 0.02 | 0.35 ± 0.03 |
| H-8 | 0.91 ± 0.04 | 0.59 ± 0.02 | 0.43 ± 0.03 |
| H-9 | 0.63 ± 0.06 | 0.52 ± 0.02 | 0.33 ± 0.02 |
| H-11 | 0.91 ± 0.04 | 0.59 ± 0.02 | 0.43 ± 0.03 |
| H-12 / H-13 | 0.91 ± 0.01 | 0.54 ± 0.00 | 0.40 ± 0.01 |
| | 0.93 ± 0.01 | 0.55 ± 0.00 | 0.41 ± 0.01 |
| H-14 | 1.40 ± 0.04 | 0.80 ± 0.01 | 0.63 ± 0.05 |
| H-15 | 1.11 ± 0.02 | – | – |

4.4 SPR-Studien

Mittels der SPR-Technik lassen sich Bindungsstudien in einem Fließsystem unter Echtzeitverfolgung durchführen. Ziel dieser Studien war eine Überprüfung der Spezifität der Interaktion zwischen der (+)-Germacren D Synthase und den Farnesylphosphaten FMP und FDP in TBS. Die Messungen erfolgten an einem Biacore T100 Gerät. Zunächst wurde die (+)-Germacren D Synthase auf der Oberfläche eines CM5-Chips immobilisiert. Die Belegung erfolgte standardmäßig über eine Aminkupplung, bei der als reaktive Gruppe entweder die Aminofunktion des N-Terminus oder die Aminofunktionen von Lysinseitenketten dient. Da die (+)-GDS ein durch zwei *loops* verschließbares aktives Zentrum besitzt und beide *loops* potentielle Lysinreste für eine Bindung an der Chipoberfläche enthalten, wurde versucht das Enzym in Ab- und in Anwesenheit von FMP über die Chipoberfläche zu leiten. Durch die Coinjektion mit dem Liganden sollte die Wahrscheinlichkeit einer Immobilisierung über Aminosäuren in der Nähe der *loops* verringert werden, da eine solche Bindung das aktive Zentrum unzugänglich machen würde. Im ersten Ansatz erfolgte die Belegung durch eine 0.8 pM Lösung des Enzyms in Acetat-Puffer (54 mg/mL) bei einer Flussrate von 10 mL/min. Dabei gelang die Immobilisierung von 70 pmol Enzym, entsprechend einem maximalen theoretischen RU-Wert ($RU_{\text{theor.}}$) von 25 RU bezogen auf das FMP. Im zweiten Ansatz wurde die (+)-Germacren D Synthase (1.3 pM, 84 mg/mL) mit Farnesylmonophosphat (200 pM) in Acetat-Puffer coinjiziert. Die Injektion erfolgte fünfmal für je 600 s, sowohl mit einer Flussrate von 10 mL/min als auch mit 20 mL/min. Insgesamt gelang nur die Immobilisierung von 18 pmol Enzym, was einem maximalen theoretischen RU-Wert von 6.5 RU (für FMP) und einem Viertel der Belegung ohne Coinjektion entspricht. Deshalb wurden die Messungen mit der zuerst belegten Flusszelle durchgeführt.

Für die Interaktionsstudie wurden die beiden Liganden FMP und FDP jeweils in verschiedenen Konzentrationen (0.01 – 0.5 mM) für 60 s bei einer Flussrate von 10 mL/min über die belegte Chipoberfläche geleitet. Abbildung 45 zeigt das erhaltene Sensorgramm für das FMP. Man erkennt eine schnelle Einstellung des Gleichgewichtszustandes (*steady state*) etwa 5-10 s nach Beginn der Injektion. Nach Beendigung der Injektion regeneriert das System in derselben Zeit. Die Vermessung des FMP zeigte allerdings einige Schwankungen in der Basislinie die eine genaue Bestimmung der Gleichgewichtswerte erschwerten. Deshalb wurden die SPR-Antworten jeweils kurz nach Erreichen des *steady state* (10 s nach Injektionsstart) und kurz vor Injektionsende (50 s nach Injektionsstart) bestimmt. Aus der

Auftragung für die jeweiligen SPR-Antworten gegen die Ligandkonzentrationen konnte die Bindungskonstante für die Interaktion des FMP mit der (+)-Germacren D Synthase nach dem *one-site binding* Modell ermittelt werden. Abbildung 46 zeigt den *fit* für die SPR-Antworten die 50 s nach Injektionsstart bestimmt wurden. Die beiden so ermittelten Dissoziationskonstanten sind mit $K_D = 84 \mu\text{M}$ und $K_D = 93 \mu\text{M}$ nahezu identisch.

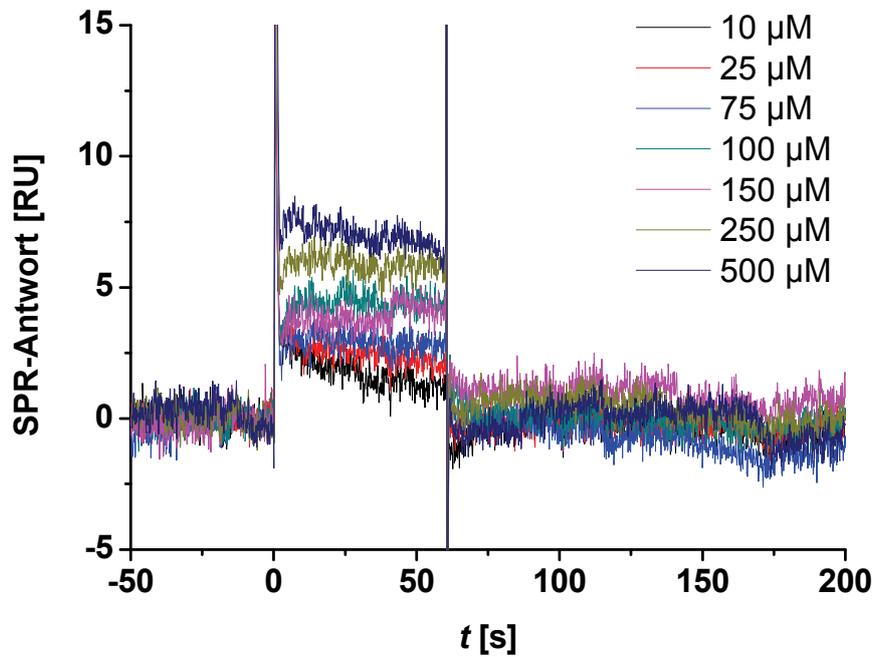


Abbildung 45: SPR-Sensorgramm für die Bindung von FMP an die (+)-Germacren D Synthase bei einer Chipbelegung von 70 pmol.

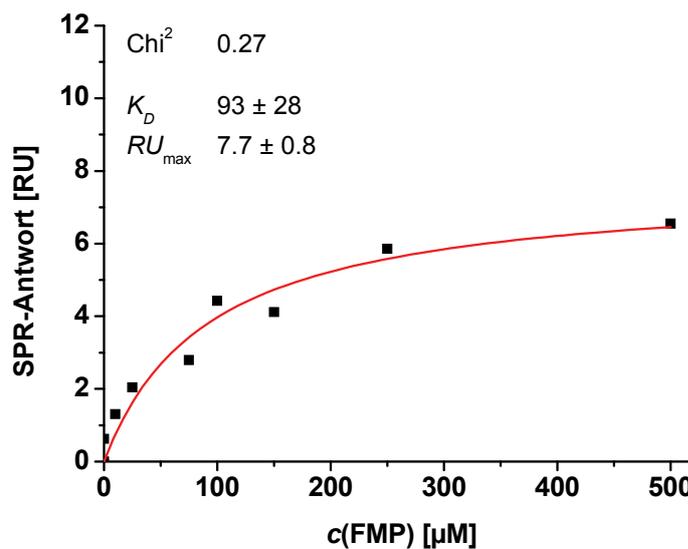


Abbildung 46: Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Interaktion zwischen dem FMP und der (+)-Germacren D Synthase nach dem *one-site binding* Modell.

Das Sensorgramm des FDP zeigt direkt nach Injektionsstart einen sehr schnellen Anstieg der Messkurve, bis sich der *steady state* nach etwa der Hälfte der Injektionszeit einstellt (Abbildung 47). Nach dem Injektionsende regeneriert sich das System vergleichbar schnell, wie auch bereits für die FMP Messreihe verzeichnet wurde. Die Auswertung erfolgte ausschließlich 50 s nach Injektionsbeginn. Die Auftragung der SPR-Antworten im *steady state* gegen die Substratkonzentration lässt sich entsprechend der FMP Messreihe nach dem *one-site binding*-Modell auswerten, obwohl der erste (10 μM) und der letzte Datenpunkt (500 μM) von den übrigen abweichen und für den *fit* nicht berücksichtigt wurden (Abbildung 48). Es ergibt sich eine etwas stärkere Bindungskonstante von $K_D = 75 \mu\text{M}$, der Verlauf der Bindungskurve sieht jedoch derjenigen für das FMP ähnlich. Die Abweichung des letzten Datenpunktes weist auf unspezifische Wechselwirkungen bei höheren FDP-Konzentrationen hin. Diese könnte auf eine unspezifische Bindung von FDP auf der Proteinoberfläche zurückzuführen sein. Denkbar wäre aber auch die Detektion eines zweiten Bindungsereignisses durch die einsetzende Aggregation des Farnesyldiphosphats. Eine eindeutige Erklärung kann auf Grundlage dieser zwei Messreihen nicht gegeben werden.

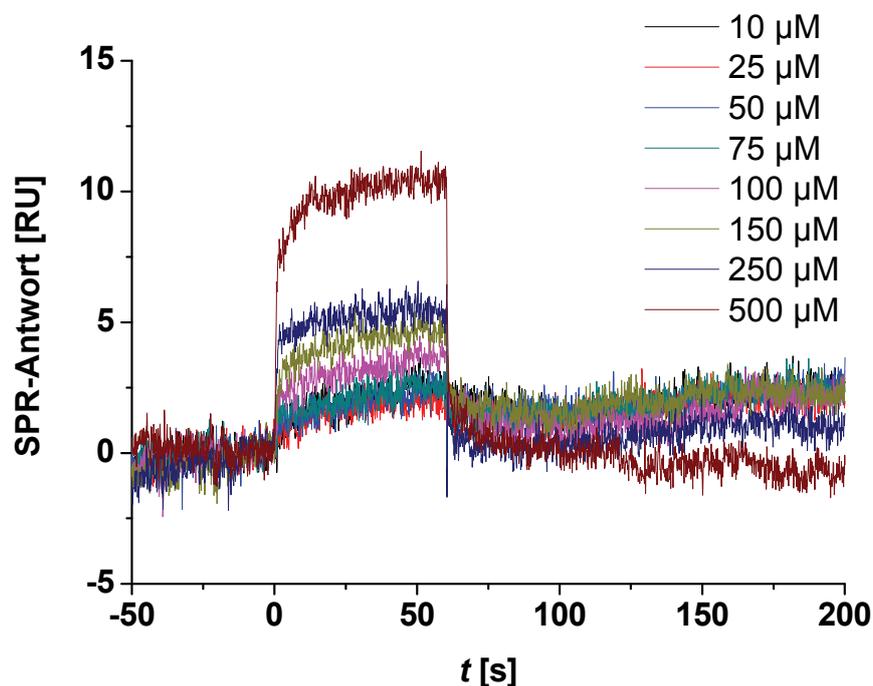


Abbildung 47: SPR-Sensorgramm für die Bindung von FDP an die (+)-Germacren D Synthase bei einer Chipbelegung von 70 pmol.

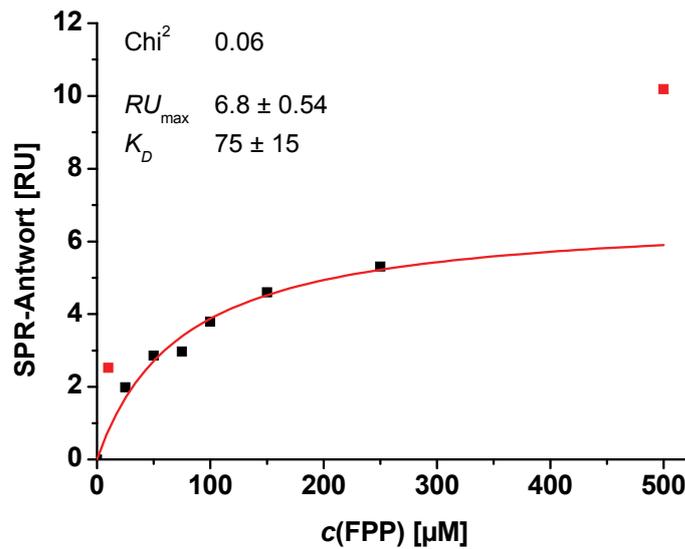


Abbildung 48: Bestimmung der Dissoziationskonstante für die Interaktion zwischen dem FDP und der (+)-Germacren D Synthase nach dem *one-site binding Modell*.

Die durchgeführten SPR-Experimente lassen einige wichtige Schlussfolgerungen bezüglich der Geschwindigkeitskonstanten der durch die (+)-Germacren D Synthase katalysierten Reaktion zu. Das einfachste einer enzymkatalysierten Reaktion zugrunde liegende Reaktionsschema ist das der Michaelis-Menten-Kinetik:



Bei hohen Substratüberschüssen, wie sie bei den SPR-Experimenten angewandt wurden, entspricht typischerweise die Geschwindigkeitskonstante k_2 der Wechselzahl k_{cat} des Enzyms. Mit einem k_{cat} von 0.02 s^{-1} ist die (+)-GDS ein verhältnismäßig langsames Enzym. Aus $1/k_{cat}$ folgt unter Substratsättigung die Umsatzdauer für ein Substratmolekül, die somit im Bereich von 50 s liegt. Dabei wird zunächst deutlich, warum die enzymkatalysierte Reaktion für eine Bindungsstudie bei einer Injektionszeit von 60 s keine Rolle spielt.

Die Michaelis-Menten-Konstante entspricht dem Quotienten aus $(k_{-1} + k_2)/k_1$. Wenn die Dissoziation von dem Enzym sehr viel größer als der Umsatz des Produktes ist ($k_{-1} \gg k_2$), dann geht der Quotient in k_{-1}/k_1 über. K_M entspricht in dem Fall der Dissoziationskonstanten K_D des Enzym-Substrat-Komplexes. Die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- und Dissoziationsreaktion k_1 und k_{-1} lassen sich aus dem Anstieg und dem Abfall der Bindungskurven des Sensorgramms abschätzen. Eine Abschätzung für k_{-1} erfolgte

exemplarisch für die Dissoziationskurve der 250 μM FDP-Probe. Sie lässt sich nach Gleichung 15 *fitten*:¹⁰³

$$R(t) = R_{eq} + R_{max} e^{-(k_{-1}(t-t_0))}$$

Gleichung 15: Bestimmung der Geschwindigkeitskonstante k_{-1} aus der Dissoziationsreaktion im SPR-Sensorgramm.

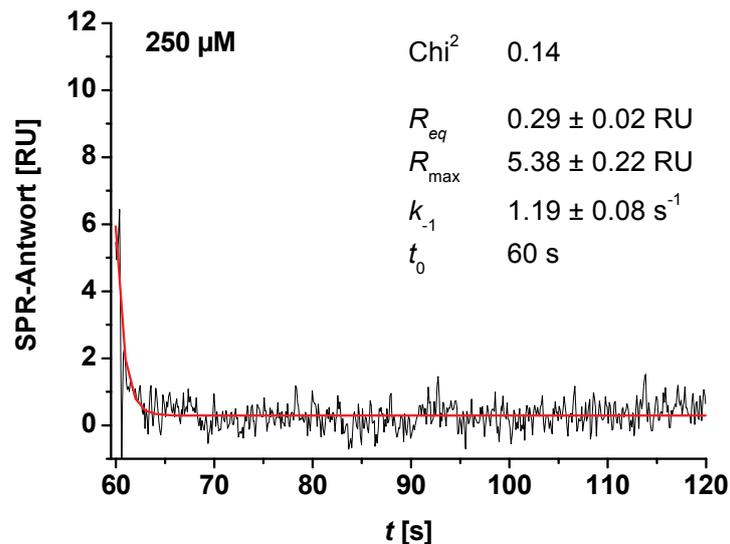


Abbildung 49: Bestimmung der *off-rate* k_{-1} für das FDP aus der Dissoziationskurve im SPR-Sensorgramm nach Gleichung 15.

Demnach ergibt sich eine *off-rate* k_{-1} von etwa 1.2 s^{-1} . Dieser Wert ist um einen Faktor von 60 höher als die Wechselzahl k_{cat} , und verdeutlicht noch einmal, warum in dem Messzeitraum das Bindungsereignis die beobachtbare Größe darstellt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit war ein STD-Experiment zur Untersuchung des Bindungsereignisses des Substrats an die (+)-Germacren D Synthase geplant. Für das Gelingen haben die abgeschätzte Größe von k_{-1} und das Verhältnis k_{-1}/k_{cat} weit reichende Folgen. Die *off-rate* liegt zunächst einmal in einer Größenordnung, die für STD-Experimente gut zugänglich ist ($> 0.01 \text{ s}^{-1}$). Ferner sollte durch das günstige Verhältnis von k_{-1}/k_{cat} ein ausreichend hoher Durchsatz an Substratmolekülen gewährleistet sein, um das Auftreten von STD-Signalen zu ermöglichen.

4.5 STD-Experimente an der (+)-Germacren D Synthase

In den folgenden Abschnitten werden die STD Experimente der (+)-Germacren D Synthase mit den beiden Farnesylphosphaten FMP und FDP beschrieben. Zunächst wurden Bindungsstudien mit dem Farnesylmonophosphat durchgeführt. Die Experimente sollten noch einmal die spezifische Interaktion zwischen dem Liganden und dem Enzym bestätigen. Ferner wurde der Einfluss der Magnesiumkonzentration auf die Bindungskonstante untersucht.

Für die Auswertung der Daten waren die oben beschriebenen Voruntersuchungen entscheidend. Wie diese gezeigt haben, steigen die Signalintensitäten in den STD-Artefaktspektren parallel mit der Konzentration des Liganden an und stellen somit ein Maß für den Aggregationsgrad dar, also dem Anteil der Micellen in der Lösung. Bei STD-Titrationsreihen in Gegenwart eines Proteins nimmt die Größe des STD-Effektes innerhalb einer Titrationsreihe ab, da der Anteil an gesättigten Ligandmolekülen im Verhältnis zu den nicht gesättigten ebenfalls abnimmt. Sind die Abhängigkeiten der STD- und Artefaktintensitäten von den Konzentrationen etwa gleich groß aber entgegengesetzt, führt dies dazu, dass innerhalb der Titrationsreihe keine Änderung der STD-Intensitäten auftritt. Dadurch kann der Eindruck entstehen, dass ausschließlich unspezifische Wechselwirkungen auftreten. Genau dieses Verhalten war bei den Experimenten aufgetreten und nur die Aufschlüsselung der Anteile der Signalintensitäten zu Proteinbindung und Micellbildung ermöglichte eine Bestimmung der Bindungskonstanten.

Der zweite Teil beinhaltet die Experimente mit dem Farnesyldiphosphat. Die STD-Experimente haben bei laufender Enzymreaktion stattgefunden. Es wurde versucht, ein inkrementiertes STD-Spektrum aufzunehmen um einerseits die bindungsspezifischen Informationen, wie das Bindungsepitop, aus dem Experiment zu erhalten und gleichzeitig enzymkinetische Daten zu generieren. Eine sorgfältige Analyse der Daten sollte klären, welche Informationen das Experiment über die Bindungs- und Reaktionsgleichgewichte liefern kann. Abschließend wurde das Bindungsepitop von FDP mit dem von FMP verglichen.

4.5.1 Bindungsstudie der (+)-Germacren D Synthase mit Farnesylmonophosphat

Abbildung 50 zeigt ein STD-Spektrum der Bindung von FMP an die (+)-Germacren D Synthase in *d*TBS mit 10 mM MgCl₂ im 44-fachen Überschuss. Für die Proteinsättigung wurden die bereits bestimmten Parameter übernommen (Sättigungspuls bei 7.5 ppm, 35 dB

Leistung, 2 s Sättigungsdauer). Zur Unterdrückung der Proteinresonanzen wurde ein Spinlock von 15 ms angewandt. Als Pulsprogramm wurde *stdiffesgp2d.th* gewählt, eine modifizierte Bruker-Standardsequenz basierend auf dem Pulsprogramm *stdiffesgp.3*, die eine pseudo-2D-Variante des STD-Experimentes darstellt und mit einer *excitation sculpting* Sequenz für die Wasserunterdrückung versehen ist (s. Anhang, S. 194).

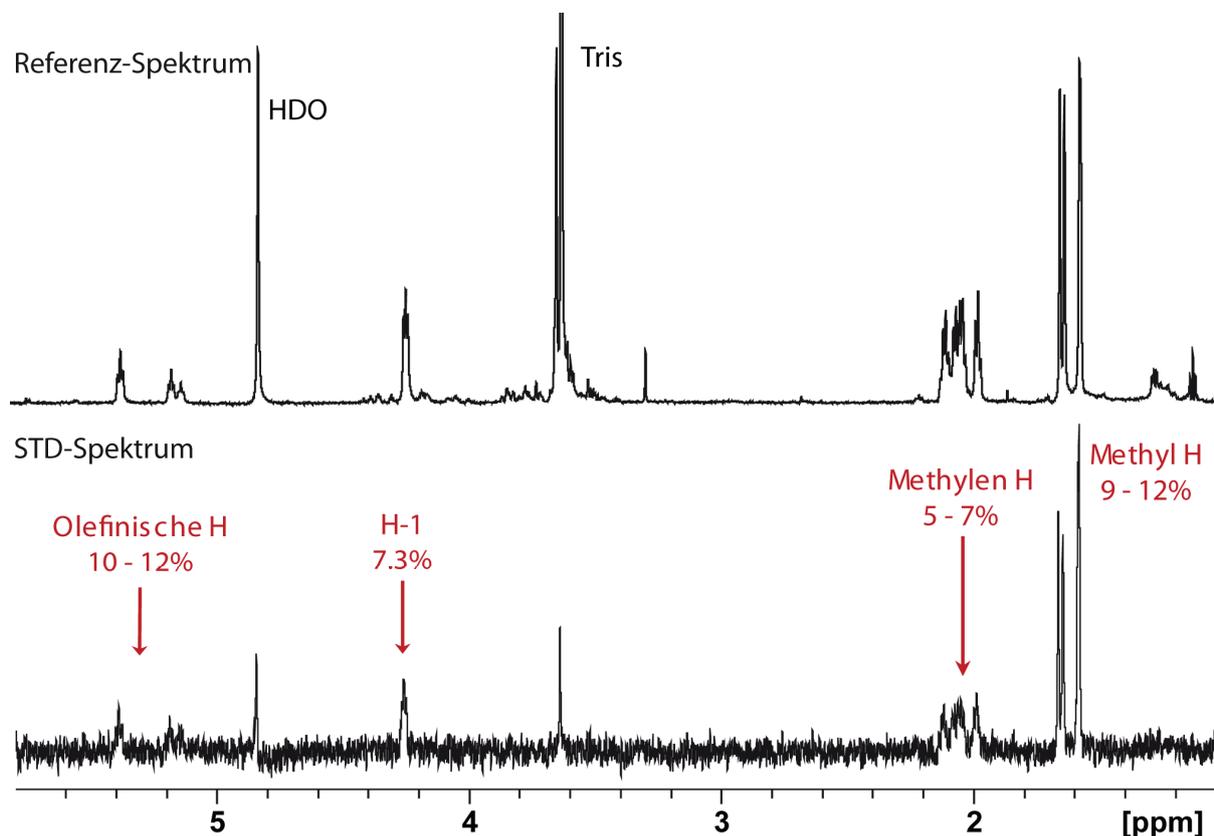


Abbildung 50: 700 MHz STD-NMR-Spektrum bei 44-fachem Ligandüberschuss (FMP: 105.4 μM ; (+)-GDS: 2.4 μM) in *d*TBS, 10 mM MgCl_2 . Aufnahmeparameter: Tabelle 71, S. 170.

Das Spektrum zeigt STD-Intensitäten für alle Ligandsignale, ca. 5-7% für die Methylenprotonen und 9-12% für die Methyl- und Olefinbindungsprotonen. Die Signale liegen um einen Faktor 5-10 höher als die beobachteten Artefaktssignale, die unter identischen Aufnahmebedingungen ohne Protein erhalten wurden. Die STD-Signale können somit leicht korrigiert werden (Tabelle 15).

Tabelle 15: STD-Experiment von FMP (105.4 μM) mit der (+)-GDS (2.4 μM) in *d*TBS, 10 mM MgCl_2 . *STD*: gemessene STD%; *STD_{Artef.}*: STD% bestimmt in den Artefaktmessungen; *STD_{korr.}*: korrigierte STD%.

| | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|------|------|------|------|
| <i>STD</i> | 7.3 | 9.7 | 6.4 | 4.9 | 10.4 | 6.7 | 5.6 | 12.1 | 9.3 | 10.3 | 11.9 | 9.1 |
| <i>STD_{Artef.}</i> | 1.0 | 1.7 | 0.9 | 0.7 | 1.6 | 1.0 | 0.9 | 1.4 | 1.3 | 1.5 | 1.8 | 1.2 |
| <i>STD_{korr.}</i> | 6.3 | 8.0 | 5.5 | 4.2 | 8.8 | 5.7 | 4.7 | 10.7 | 8.0 | 8.8 | 10.1 | 7.9 |

Des Weiteren wurde eine STD-Titration in *d*TBS (10 mM MgCl_2) mit Konzentrationen von 27.2 μM bis 304.8 μM durchgeführt. Die Daten konnten nach dem *one-site binding Modell* gefittet werden (Abbildung 51). Allerdings zeigten die Messpunkte ab einer Konzentration von 154.8 μM eine Abweichung vom Kurvenverlauf und ergaben eine lineare Konzentrationsabhängigkeit. Diese lässt auf unspezifische Wechselwirkungen zwischen dem FMP und der (+)-GDS schließen.

Tabelle 16: Bindungskonstanten aus der STD-Titration von FMP mit der (+)-GDS (*d*TBS, 10 mM MgCl_2).

| | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|-------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| K_D [μM] | 841 | 217 | 391 | 610 | 93 | 188 | 108 | 215 | 482 | 853 | 433 | 483 |

Die Bindungskonstanten für die individuellen Protonensignale liegen bei 93-853 μM (Tabelle 16). Die niedrigste Dissoziationskonstante mit $K_D = 93 \mu\text{M}$ für das Proton H-6 ist identisch mit der mittels SPR ermittelten. Dass bei STD-NMR-Experimenten verschiedene Bindungskonstanten für die einzelnen Ligandprotonen erhalten werden ist normal, da der exakte Kurvenverlauf nicht nur von der Kinetik der Austauschreaktion sondern zusätzlich von den intermolekularen Protonenabständen, der Zeitkonstante für den Sättigungstransfer und den T_1 -Relaxationszeiten abhängt. Ein weiterer Faktor für die hohen Schwankungen bei den einzelnen Bindungskonstanten ist die Tatsache, dass durch den Wegfall von zwei Messpunkten nur noch drei echte Messpunkte für den *fit* zur Verfügung stehen. Dadurch können schon geringe Abweichungen zu verhältnismäßig großen Fehlern führen.

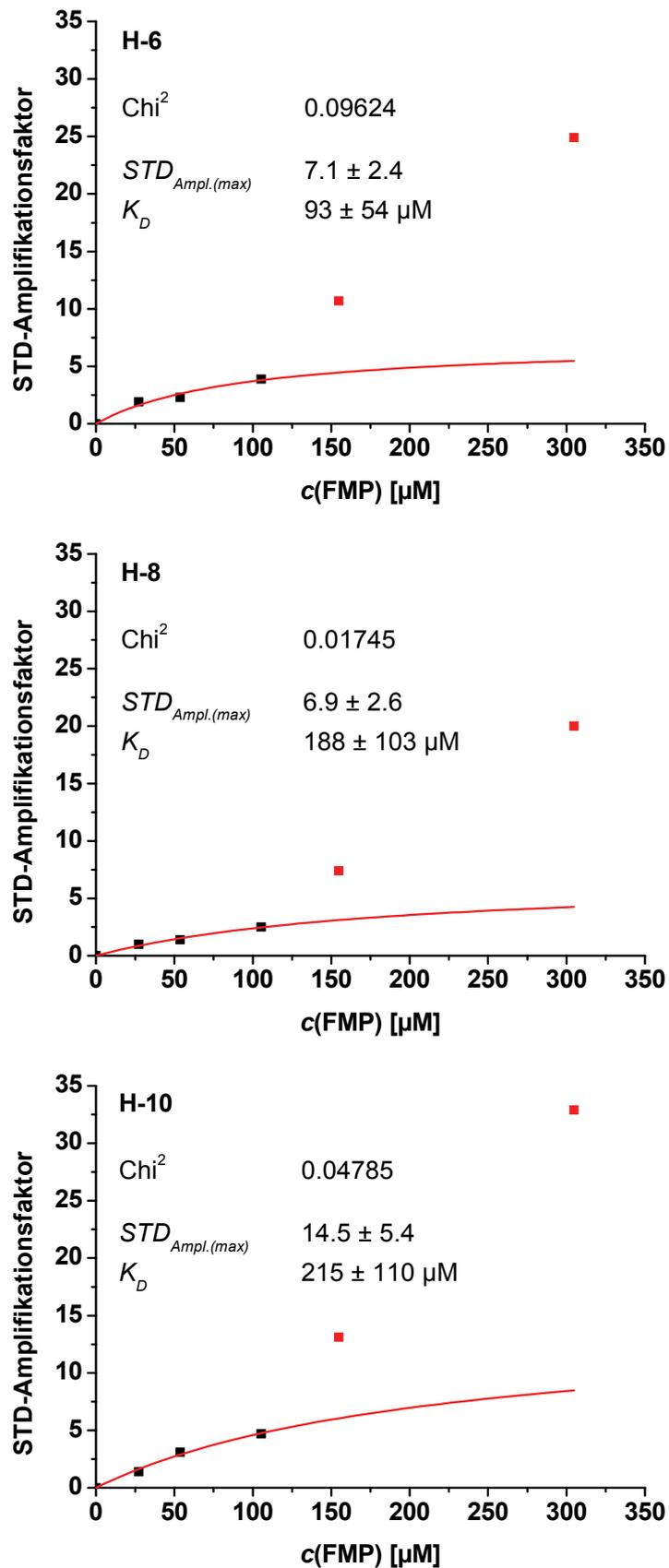


Abbildung 51: Bindungskurven der Protonensignale von H-6, H-8 und H-10 für die STD-Titration von FMP gegen die (+)-GDS nach dem *one-site binding Modell* (dTBS, 10 mM MgCl₂).

Die Ursache der unspezifischen Wechselwirkung ist ungeklärt, da sie bei den SPR-Messungen für das FMP nicht beobachtet wurde, obwohl sogar mit Konzentrationen bis zu 500 μM gearbeitet wurde. Auf der anderen Seite haben sich unspezifische Wechselwirkungen bei den SPR-Experimenten mit höheren Konzentrationen des FDP ergeben. Aufgrund der Micellbildung ergibt sich in der Probe ein komplexes Bindungsgleichgewicht, das vereinfacht wie in Abbildung 52 zusammengefasst werden kann.



Abbildung 52: Bindungsgleichgewichte in der NMR-Probe der STD-Titration. FMP_m : FMP-Monomere; $[\text{FMP}]_{\text{Mic}}$: FMP-Micellen. $[(+)\text{-GDS-FMP}]$: Protein-Ligand-Komplex.

Die Micellbildung selbst kann nicht für die hohen STD-Antworten verantwortlich sein, da hierfür die Artefaktmessungen durchgeführt worden sind. Es wäre aber denkbar, dass bei den höheren Micellkonzentrationen Liganden mehrfach durch das Protein und in den Micellen gesättigt werden und sich hieraus ein Verstärkungseffekt ergibt.

In einer zweiten Messreihe wurde die Magnesiumkonzentration im Tris-Puffer um den Faktor 10 auf 1 mM reduziert. Um die Vergleichbarkeit zu dem vorhergehenden Experiment zu gewährleisten, wurde die Titration mit denselben Zugaben an FMP durchgeführt. Nach Abzug der Artefakte fallen die STD-Intensitäten ähnlich aus wie in dem Puffer mit der höheren Magnesiumkonzentration (Tabelle 17). Die Auftragung der STD-Amplifikationsfaktoren gegen die FMP-Konzentration liefert aber deutlich höhere Bindungskonstanten. Diese liegen im Bereich von 227-2282 μM . Die niedrigste Bindungskonstante beträgt $K_D = 227 \mu\text{M}$ für das Proton H-10 und ist um einen Faktor 2.4 höher als bei dem 10 mM MgCl_2 -haltigen Puffer (Tabelle 18).

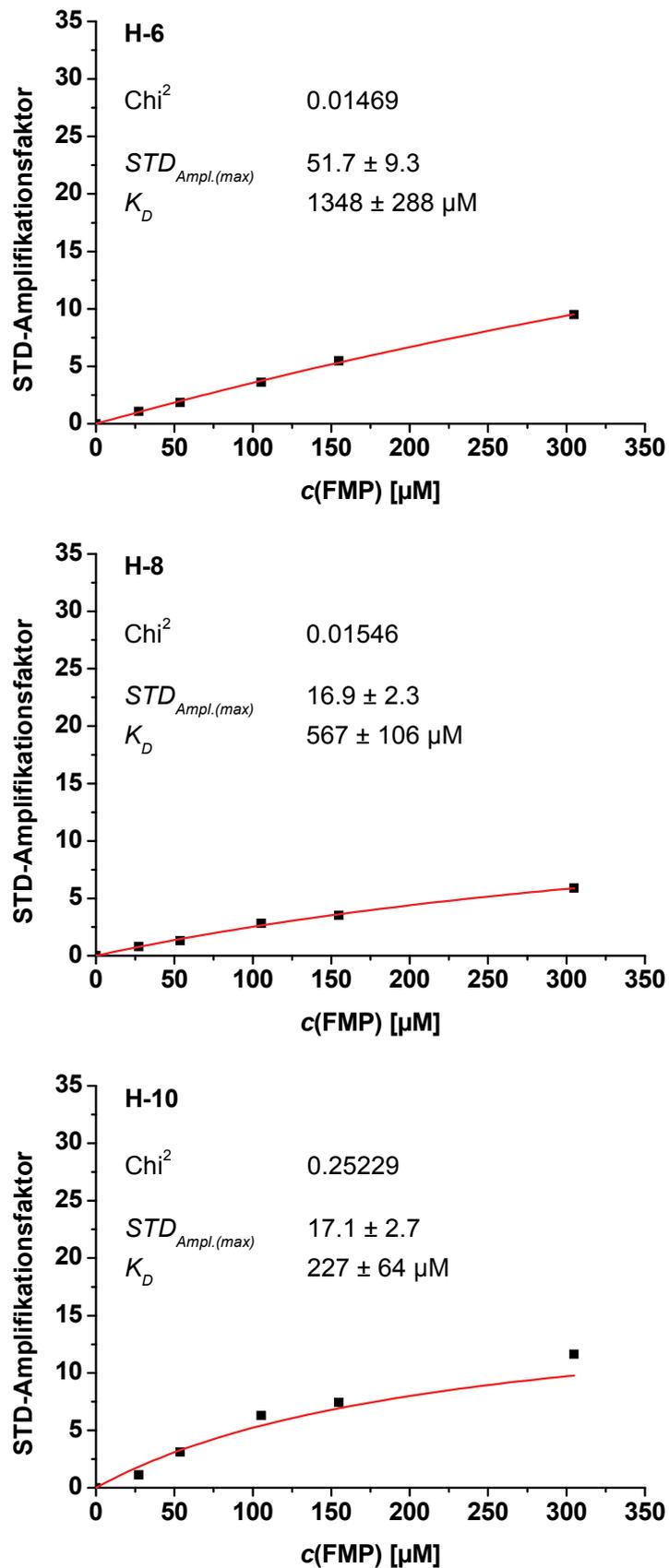


Abbildung 53: Bindungskurven der Protonensignale von H-2, H-4 und H-15 für die STD-Titration von FMP gegen die (+)-GDS nach dem *one-site binding Modell* (dTBS, 1 mM MgCl₂).

Tabelle 17: STD-Experiment von FMP (105.4 μM) mit der (+)-GDS (2.4 μM) in *d*TBS, 1 mM MgCl_2 . *STD*: gemessene STD%; *STD_{Artef.}*: STD% bestimmt in den Artefaktmessungen; *STD_{korrr.}*: korrigierte STD%.

| | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|-----------------------------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| <i>STD</i> | 6.3 | 10.4 | 6.1 | 5.3 | 9.2 | 6.9 | 6.3 | 15.8 | 9.2 | 9.6 | 11.4 | 8.7 |
| <i>STD_{Artef.}</i> | 0.4 | 0.9 | 0.6 | 0.5 | 0.9 | 0.5 | 0.6 | 1.5 | 0.8 | 0.9 | 1.2 | 0.8 |
| <i>STD_{korrr.}</i> | 5.9 | 9.6 | 5.5 | 4.8 | 8.3 | 6.4 | 5.7 | 14.3 | 8.3 | 8.7 | 10.2 | 7.9 |

Tabelle 18: Bindungskonstanten aus der STD-Titration von FMP mit der (+)-GDS (*d*TBS, 1 mM MgCl_2).

| | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|--|------|-----|-----|------|------|-----|-----|------|------|------|------|------|
| <i>K_D</i> [μM] | 2282 | 894 | 640 | 1403 | 1348 | 567 | 698 | 227 | 726 | 619 | 686 | 772 |

Vergleicht man die Bindungskonstanten beider Titrationsexperimente, dann liegen die Werte aus der zweiten Messreihe für die meisten Protonen um einen Faktor 2-3 höher als die Werte aus der ersten Messreihe. Ausnahmen sind die Bindungskonstanten für die Protonen H-6, H-9, H-10 und H-13. Diese Signale sind entweder durch Signalüberlagerungen (H-9 und H-13) oder durch ein schlechtes *S/N*-Verhältnis (H-6 und H-10), begünstigt durch die Wasserunterdrückung, schwieriger auszuwerten. Aufgrund der geringen Zahl der Datenpunkte, die für die Auswertung zur Verfügung standen, liegt für diese Protonen der größte Unsicherheitsfaktor vor. Für die Bestimmung der Bindungskonstanten wurde deshalb das Signal der H-8-Methylengruppe zugrunde gelegt, so dass die Titrationen Bindungskonstanten von $K_D = 188 \mu\text{M}$ (10 mM MgCl_2) und $K_D = 567 \mu\text{M}$ (1 mM MgCl_2) lieferte. Für die erste Titrationsreihe wurde somit eine Bindungskonstante erhalten, die vergleichbar mit den Ergebnissen der SPR-Experimente ist. Die Bindungsepitope, die sich aus den STD-Experimenten beider Messreihen ergeben stimmen gut miteinander überein. Das spricht dafür, dass das Magnesium keinen Einfluss auf den Bindungsmodus hat.

4.5.2 Untersuchung der Enzymreaktion der (+)-Germacren D Synthase

Die Erhebung kinetischer Daten enzymkatalysierter Reaktionen spielt in der Molekularbiologie eine große Rolle, da sie Einblicke in die mechanistischen Details der Reaktion erlauben. Historisch hat sich die Kinetik nach Michaelis und Menten durchgesetzt. Dies liegt auch daran, dass es keine exakte Lösung für die zugrunde liegenden Differentialgleichungen gibt. Eine Lösung mittels numerischer Ansätze ist erst durch die

Entwicklung der Computertechnologie praktikabel und handhabbar geworden. Seit dem gibt es eine Reihe von Publikationen, die sich mit der Analyse von so genannten Progresskurven beschäftigen.⁸¹⁻⁸³ Dabei ergeben sich die kinetischen Parameter nicht wie im klassischen Fall aus den Initialgeschwindigkeiten bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen, sondern es wird der gesamte Konzentrations-Zeit-Verlauf bei einer Substratkonzentration betrachtet. Die Auswertung erfolgt entsprechend der integrierten Form der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 8). Es ist allerdings wichtig zu beachten, dass die *steady-state* Näherung ihre Gültigkeit verliert. Als Konsequenz erhält man die apparenten Größen V'_{\max} und K'_M , die von den Werten abweichen können, die nach der Methode der Initialgeschwindigkeiten erhalten werden. Auf der anderen Seite enthalten V'_{\max} und K'_M z.B. Informationen über Produktinhibition, die in die integrierte Form der Michaelis-Menten-Gleichung einbezogen werden können und zusätzliche mechanistische Rückschlüsse zulassen. Die computergestützte Auswertung hilft, auch komplizierte Gleichungssysteme zu lösen.

Die NMR-Spektroskopie lässt sich generell für die Verfolgung einer Reaktion einsetzen. Die stetig steigende Empfindlichkeit der Spektrometer ermöglicht auch die Verfolgung kleiner Substanzmengen mit nur wenigen *scans*, so dass Messpunkte im Abstand von Sekunden aufgenommen werden können. Ein Vorteil ist die direkte *online*-Verfolgung des Umsatzes, die keine Markierung für die Detektion des Substrats oder Produkts erfordert.

Das Ziel für die in diesem Abschnitt beschriebenen Versuche war die Verknüpfung der STD-Methode mit der NMR-spektroskopischen Aufzeichnung der Progresskurve der durch die (+)-Germacren D Synthase katalysierten Reaktion. Ein solches Experiment liefert direkt Informationen über die an der Bindung beteiligten Gruppen mit atomarer Auflösung. Die dazu ablaufende Reaktion stellt sicher, dass das Enzym in der bioaktiven Konformation vorliegt. Durch die Analyse der Progresskurve können V'_{\max} und K'_M bestimmt werden. Das zu untersuchende Enzym-Substrat-System muss allerdings die Bedingung $k_{-1} > k_{cat}$ erfüllen, damit ein ausreichend hoher Durchsatz an gesättigten Ligandmolekülen und der damit verbundene Verstärkungseffekt erreicht wird. Je nach Intensität des STD-Effektes ist eine mehr oder weniger hohe Anzahl an *scans* erforderlich, um ein auswertbares *S/N*-Verhältnis zu erreichen. Auch deshalb muss das k_{cat} ausreichend klein sein, damit die Reaktion langsam genug verläuft und ausreichend Messzeit für die Akquisition mehrerer Datenpunkte für die Progresskurven verfügbar ist. Interessant ist die Fragestellung, ab welchem Zeitpunkt das Produkt im STD-Spektrum sichtbar wird und ob sich daraus eine Inhibitionskonstante

ermitteln lässt. Die Abschätzung von k_{-1} aus den SPR-Bindungskurven lässt für die (+)-GDS eine 60-mal höhere Dissoziationsgeschwindigkeit als die Umsatzrate vermuten, so dass die Bedingungen für ein solches Experiment optimal erfüllt sein sollten.

Für die Durchführung der STD-Kinetik-Experimente wurde die Bruker-Standardsequenz *stddiffesgp.3* modifiziert. Dieses enthält den *loop* L4, der es ermöglicht die Gesamtzahl der *scans* zu vervielfachen ($L4 = \text{number of averages} = \text{total number of scans} / \text{NS}$). Diese Technik wird üblicherweise in der 1D-NOE-Differenzspektroskopie angewendet, um Subtraktionsartefakte durch Phasen- bzw. Frequenzshifts herauszumitteln, die während langer Akquisitionszeiten entstehen können. Dabei wird die Zahl der *scans* möglichst klein gewählt (z.B. NS = 8) und die Messzeit durch Heraufsetzen von L4 verlängert. Die FIDs für jedes individuelle Spektrum werden mit 8 *scans* akquiriert und gespeichert. Sind alle FIDs aufgezeichnet beginnt ein neuer *averaging cycle* und es werden für jedes Spektrum weitere 8 *scans* aufgezeichnet. Diese FIDs werden an derselben Stelle wie die vorher aufgenommenen gespeichert und hinzuaddiert.

Bei der pseudo-2D-Variante des STD-Experiments werden das *on-* und *off-resonance* Spektrum mit den jeweiligen Einstrahlfrequenzen der Sättigungspulse in zwei Inkremente eines seriellen 2D-*files* aufgezeichnet. Die Einstrahlung erfolgt abwechselnd, die *on-* und *off-resonance* Spektren werden in zwei Inkrementen gespeichert. Das Pulsprogramm *stddiffesgp.3* wurde nun dahingehend modifiziert, dass die FIDs, die jeder *averaging cycle* generiert, in aufeinanderfolgende Inkremente geschrieben wird (vgl. Anhang ab S. 194). Dabei muss die Zahl der Inkremente (TD1) des seriellen *files* erhöht werden, um weitere akkumulierte FIDs nach Ablauf eines *cycles* zu speichern. Ein STD-Spektrum mit einem NS von 8 und einem L4 von 2 würde somit vier FIDs mit jeweils 8 *scans* generieren und diese in den Inkrementen 1 bis 4 speichern. Die Inkremente 1 und 2 entsprechen einmal einem *off-* und einem *on-resonance* Spektrum, die Inkremente 3 und 4 einem zweiten Datensatz von derselben Probe. Die seriellen Inkremente lassen sich anschließend mit dem AU-Programm *splitser* trennen und einzeln betrachten. Aus den jeweilig zusammengehörenden *off-* und *on-resonance* Spektren lassen sich zwei Differenz-(STD)-Spektren erzeugen, die genau hintereinander aufgenommen wurden. Durch Addition der beiden *off-resonance* und der beiden *on-resonance* Spektren können wiederum zwei Spektren (*off-* und *on-resonance*) mit jeweils 16 *scans* pro Spektrum gebildet werden, also die Spektren die über die gesamte Messzeit erhalten wurden.

Der *loop* L4 ermöglicht eine sequenzielle Aufnahme von STD-Spektren, die sich entweder einzeln oder nach Addition als Spektrum über die gesamte Zeit betrachten lassen. Jedes *off-resonance* Spektrum entspricht einem ^1H -NMR-Spektrum für einen bestimmten Zeitraum. In einem ersten Versuch wurde eine Probe von 500 μM FDP und 2 μM (+)-GDS in *d*TBS (1 mM MgCl_2 , 5% $\text{DMSO-}d_6$) angesetzt (250-facher Substratüberschuss). Die entsprechende Artefaktmessung zeigte zwar vergleichsweise hohe STD-Intensitäten im Bereich von 5-10%, jedoch war es bei diesem Experiment wichtig das FDP und das (+)-GD beobachten zu können und mit einem hohen Substratüberschuss zu arbeiten, damit die Reaktion möglichst lange läuft (Abbildung 32, S. 56). Dementsprechend diente der Zusatz an DMSO dazu, das Produkt in Lösung zu halten. Die Konstante k_{cat} der (+)-GDS liegt bei 0.02 s^{-1} , so dass der Umsatz eines Substratmoleküls etwa 50 s dauert. Bei einem konstanten Umsatz über den gesamten Zeitraum wäre die Reaktion nach 210 min abgeschlossen. Durch eine Reihe von Faktoren kann angenommen werden, dass die Reaktion langsamer verläuft. Die kinetischen Parameter der (+)-GDS wurden in dem radiochemischen Enzymassay bei 303 K und mit einer MgCl_2 -Konzentration von 10 mM sowie 1 mM MnCl_2 ermittelt. Die Temperatur des NMR-Experimentes lag bei 285 K und die Konzentration der zweiwertigen Kationen war deutlich reduziert. Zusätzlich wird die Reaktionsgeschwindigkeit mit fortschreitender Zeit stetig abnehmen. Der Effekt der Produktinhibition könnte den Prozess weiter verlangsamen.

Aufgrund der hohen Artefaktintensitäten wurde mit einer geringeren Sättigungsleistung als bei den Titrationsexperimenten des FMP eingestrahlt und die Sättigungsdauer dafür etwas erhöht (45 dB, 3 s). Die Zahl der *scans* wurde auf $\text{NS} = 128$ gesetzt. Die Auflösung wurde von 32 768 auf 28 672 Datenpunkte reduziert, entsprechend einer Akquisitionszeit von 2 s. Die Aufnahme für einen Spektrensatz, bestehend aus *on-* und *off-resonance* Spektrum, betrug somit ~ 22 min. Die Zahl der *averaging cycles* (L4) wurde auf 32 gesetzt, entsprechend einer Gesamtdauer von ~ 700 min. Damit betrug die Gesamtzeit des Experiments rund dem 3.5-fachen der theoretischen Reaktionszeit.

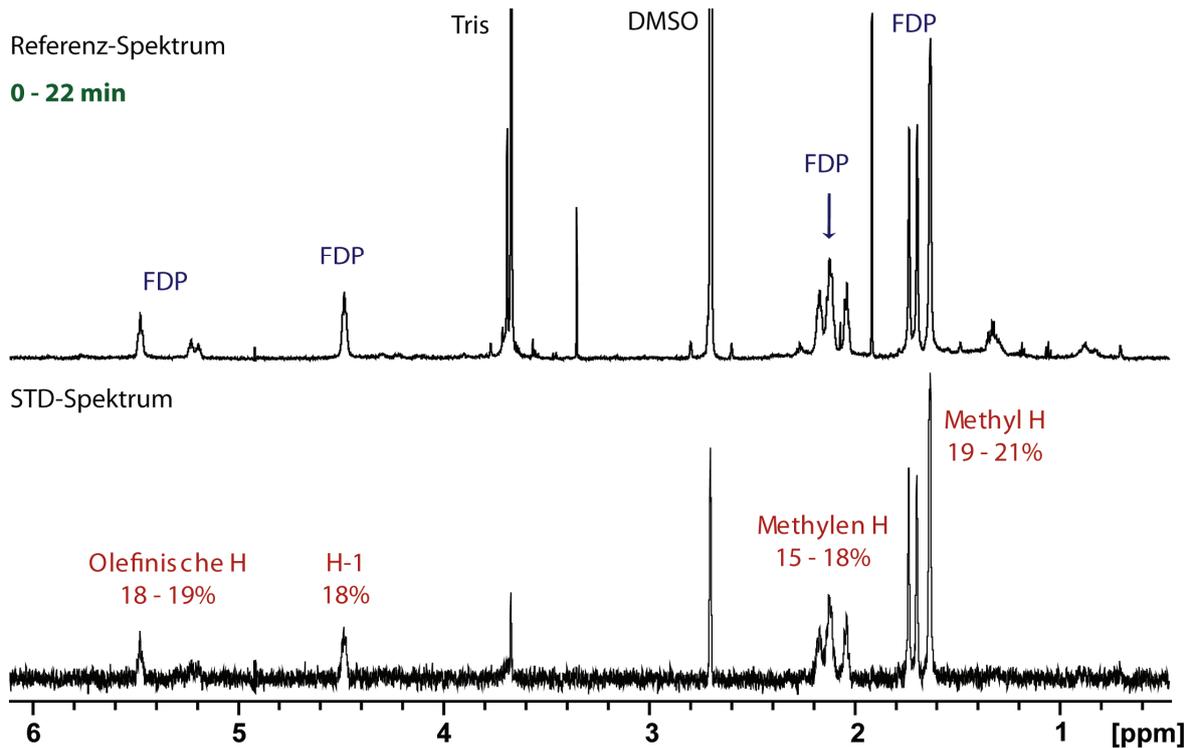


Abbildung 54: 700 MHz STD-Experiment der Enzymreaktion von Farnesyldiphosphat mit der (+)-Germacren D Synthase. Gezeigt sind das 1. Referenz- und Differenzspektrum (0-22 min). Beide Spektren zeigen ausschließlich Substratsignale. Aufnahmeparameter: Tabelle 84, S. 174.

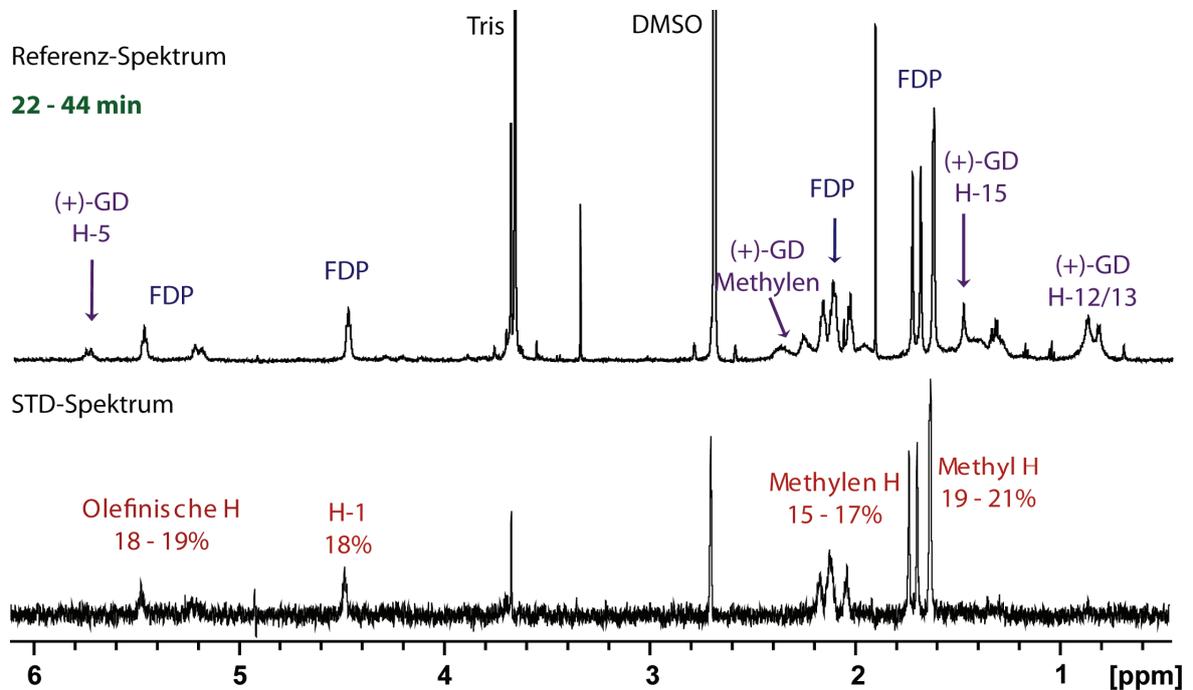


Abbildung 55: 700 MHz STD-Experiment der Enzymreaktion von Farnesyldiphosphat mit der (+)-Germacren D Synthase. Gezeigt sind das 2. Referenz- und Differenzspektrum (22-44 min). Im Referenzspektrum tauchen langsam Produktsignale auf, im STD-Spektrum sind weiterhin ausschließlich Substratsignale zu beobachten. Aufnahmeparameter: Tabelle 84, S. 174.

Die Probe wurde zunächst nur mit dem Enzym angesetzt und alle NMR-spektroskopischen Parameter eingestellt. Die Zugabe des FDP erfolgte direkt am Spektrometer und die Aufnahme des Spektrums wurde umgehend gestartet. In Abbildung 54 ist das Spektrum des ersten Zeitabschnittes zwischen 0 und 22 min dargestellt. Das Referenzspektrum zeigt fast ausschließlich Substratsignale. Im STD-Spektrum sind eindeutig die Signale von FDP zu erkennen. Wie beim FMP zeigen alle Protonensignale einen STD-Effekt. Die Intensitäten liegen zwischen 15 und 21% und sind somit um einen Faktor von 2-3 höher als in dem Artefaktspektrum (vgl. Abbildung 32, S. 56).

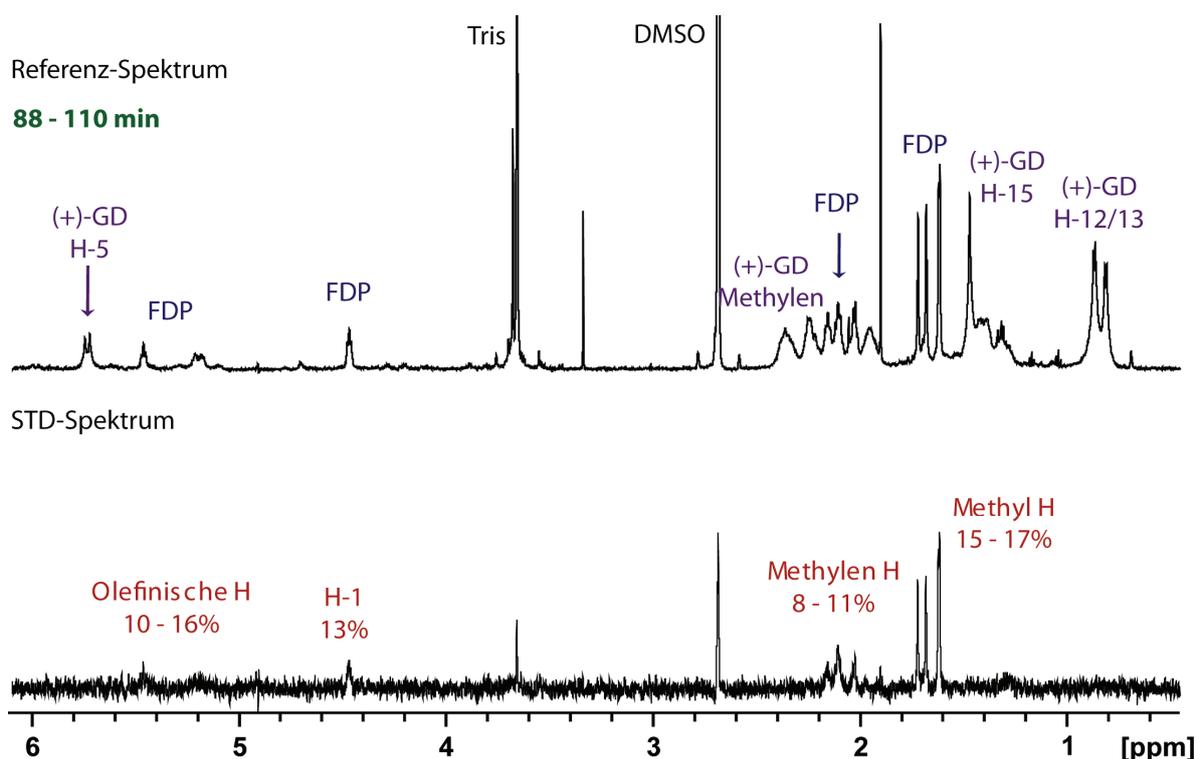


Abbildung 56: 700 MHz STD-Experiment der Enzymreaktion von Farnesyldiphosphat mit der (+)-Germacren D Synthase. Gezeigt sind das 5. Referenz- und Differenzspektrum (88-110 min). Die Reaktion ist inzwischen zu mehr als 50% abgelaufen, die Signalintensitäten im STD-Spektrum nehmen langsam ab, es sind weiterhin ausschließlich Substratsignale zu beobachten. Aufnahmeparameter: Tabelle 84, S. 174.

Die Abbildungen 55-57 zeigen die Referenz- und STD-Spektren im zweiten, fünften und 28. Zeitabschnitt und dokumentieren den Umsatz der Enzymreaktion. Nach 44 Minuten sind bereits eindeutig Produktsignale erkennbar. Das STD-Spektrum zeigt aber ausschließlich Substratsignale. Die STD-Intensitäten sind identisch mit denen im ersten Abschnitt. Nach 110 Minuten ist die Reaktion bereits zu etwa 50% abgelaufen. Im STD-Spektrum dominieren weiterhin die Substratsignale, die relativen Signalintensitäten nehmen langsam ab. Mit

11-17 STD% liegen sie aber immer noch deutlich über den Artefaktintensitäten der 500 μM FDP Probe in $d\text{TBS}/\text{DMSO}-d_6$. Besonders eindrucksvoll ist die Reaktionsgeschwindigkeit, die mit dem $\sim 50\%$ igen Umsatz im Rahmen des theoretisch berechneten Zeitfensters liegt. Die veränderten Reaktionsbedingungen wirken sich weniger stark auf die Aktivität des Enzyms aus, als dies erwartet wurde.

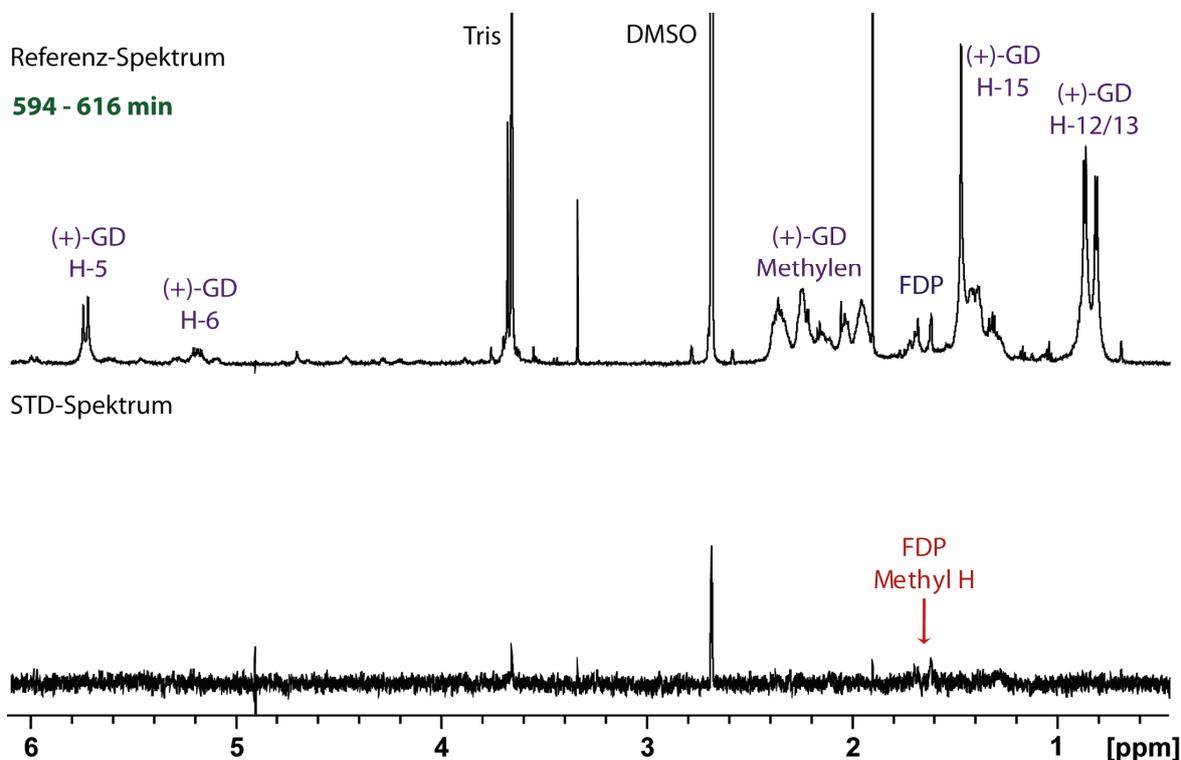


Abbildung 57: 700 MHz STD-Experiment der Enzymreaktion von Farnesyldiphosphat mit der (+)-Germacren D Synthase. Gezeigt sind das 28. Referenz- und Differenzspektrum (594-616 min). Die Reaktion ist nahezu vollständig abgelaufen, das Referenzspektrum zeigt nur noch Restsignale des FDP. Das STD-Spektrum zeigt kaum noch Signale, auch Produktsignale treten nicht auf. Aufnahmeparameter: Tabelle 84, S. 174.

Der Vergleich der Spektren des zweiten und des fünften Zeitabschnittes zeigt eine Abnahme der Intensitäten der STD-Signale (Abbildungen 55 und 56). Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass die Intensitäten mit sinkender Ligandkonzentration steigen sollten. Abbildung 58 zeigt die zeitliche Änderung der Intensitäten für die H-12 Methylprotonen, wobei sich der Trend über den Zeitraum der Auftragung fortsetzt. Das Verhalten lässt sich darauf zurückführen, dass sich die Signalintensitäten aus den Artefakten, die mit fortschreitender Zeit abnehmen, und der Sättigungsübertragung im Enzym, die mit fortschreitender Zeit zunimmt, zusammensetzt. Zusätzlich können sich die Sättigungseffekte

im Enzym und in den Micellen durch Mehrfachsättigung verstärken. Dieser Effekt nimmt ebenfalls mit fortschreitender Zeit, also mit der Abnahme der Micellkonzentration, ab.

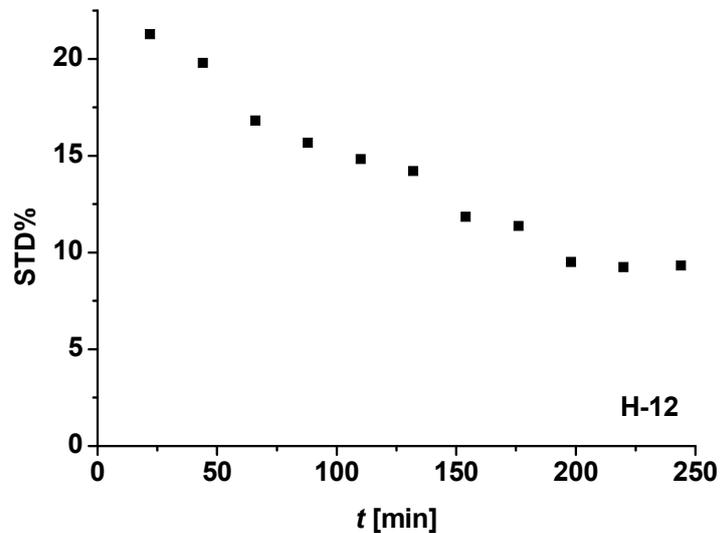


Abbildung 58: Verlauf der STD-Intensitäten in Abhängigkeit von der Zeit für die H-12 Methylprotonen. Mit fortschreitender Zeit, also mit abnehmender FDP-Konzentration, sinken die STD-Intensitäten. Der Theorie nach sollten diese aber steigen, da der Anteil an gesättigten Molekülen mit abnehmender FDP-Konzentration zunimmt. Der Effekt weist darauf hin, dass die STD-Signale eine Überlagerung aus der Enzymbindung und den Artefakten der Micellbildung repräsentieren. Die Abnahme des Artefaktanteils ist schneller als die Zunahme der STD-Intensitäten.

Das vierte Spektrum, das präsentiert wird, ist zufällig ausgewählt und zeigt nur noch Restsignale des Farnesyldiphosphats (Abbildung 57). Die Reaktion ist fast vollständig abgelaufen. Im STD-Spektrum können nur noch die Signale der FDP-Methylgruppen eindeutig zugeordnet werden. Das Produkt ist im STD-Spektrum überhaupt nicht zu erkennen. Die Aufnahme eines Zeitabschnittes umfasst aber nur 128 *scans*, was für ein STD-Spektrum aufgrund der Differenzbildung wenig ist. Die STD-Signale des FDP sind mit ~15-20% so intensiv, dass die Zahl der *scans* trotzdem ausreicht um brauchbare Spektren zu liefern. Um die Signale des Produkts sichtbar zu machen, wurden deshalb die letzten acht Spektren der Serie aufaddiert, um so ein Spektrum mit 1024 *scans* zu erzeugen. Das Ergebnis ist in Abbildung 59 gezeigt. Die Referenzspektren aus den Abbildungen 57 und 59 sind bis auf das verbesserte *S/N*-Verhältnis identisch. Im STD-Spektrum dominieren wiederum die Signale der FDP Methylgruppen. Trotzdem zeigt das STD-Spektrum jetzt eindeutig Produktsignale, von denen vor allem die Methylgruppen und das H-5 sowie einige der Methylenprotonen erkennbar sind. Die Signalintensitäten liegen im Bereich von 0.5-2 STD%.

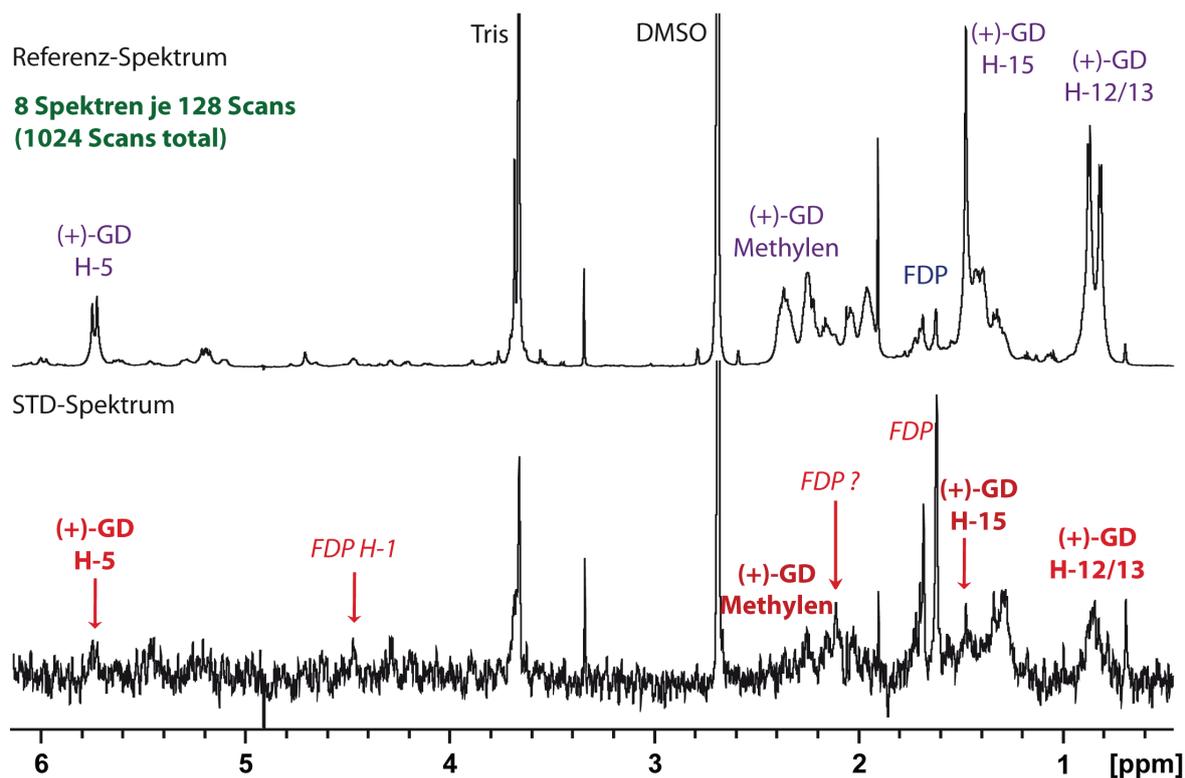


Abbildung 59: 700 MHz STD-Spektrum, das nach Ablauf der Enzymreaktion durch Addition der letzten 8 *on-* und *off-resonance*-Spektren erhalten wurde. Statt eines Differenzspektrums mit 128 *scans* resultiert ein Spektrum mit insgesamt 1024 *scans* (Verbesserung des *S/N* um 2.8). Im Differenzspektrum sind jetzt eindeutig STD-Signale der Wechselwirkung der (+)-Germacren D Synthase mit seinem Produkt sichtbar. Aufnahmeparameter: Tabelle 84, S. 174.

Ein vollständiger FDP-Umsatz findet nicht statt. Der Anteil in der Lösung liegt bei 5-8%. Durch den DMSO- d_6 -Anteil im Puffer wird das (+)-GD sehr gut in Lösung gehalten. Im Gegensatz zu den artifiziell hergestellten Proben für die Löslichkeitsversuche von Germacren D war nur eine geringe Trübung in der Lösung zu beobachten. Aus den geringen STD-Intensitäten von (+)-GD im Gegensatz zu dem FDP lassen sich zwei mögliche Erklärungen ableiten. Nach der ersten müsste die Tendenz von (+)-Germacren D an das aktive Zentrum zu binden äußerst gering sein, so dass diese in dem geringen Durchsatz an gesättigten Molekülen begründet liegen. Die zweite Erklärung wäre eine kleine *off-rate* der gebundenen Moleküle, die sich durch den hydrophoben Effekt begründen ließe. So sinkt die Tendenz die hydrophobe Tasche zu verlassen und in das wässrige Medium überzutreten mit steigender Konzentration an Germacren D Molekülen in der Lösung. Der zweite Erklärungsansatz beinhaltet den Faktor der Produktinhibition, der schließlich zu einem stark verlangsamten Reaktionsumsatz führen würde. Die verhältnismäßig hohen FDP-Intensitäten in dem STD-Spektrum resultieren aus dessen hoher *off-rate*.

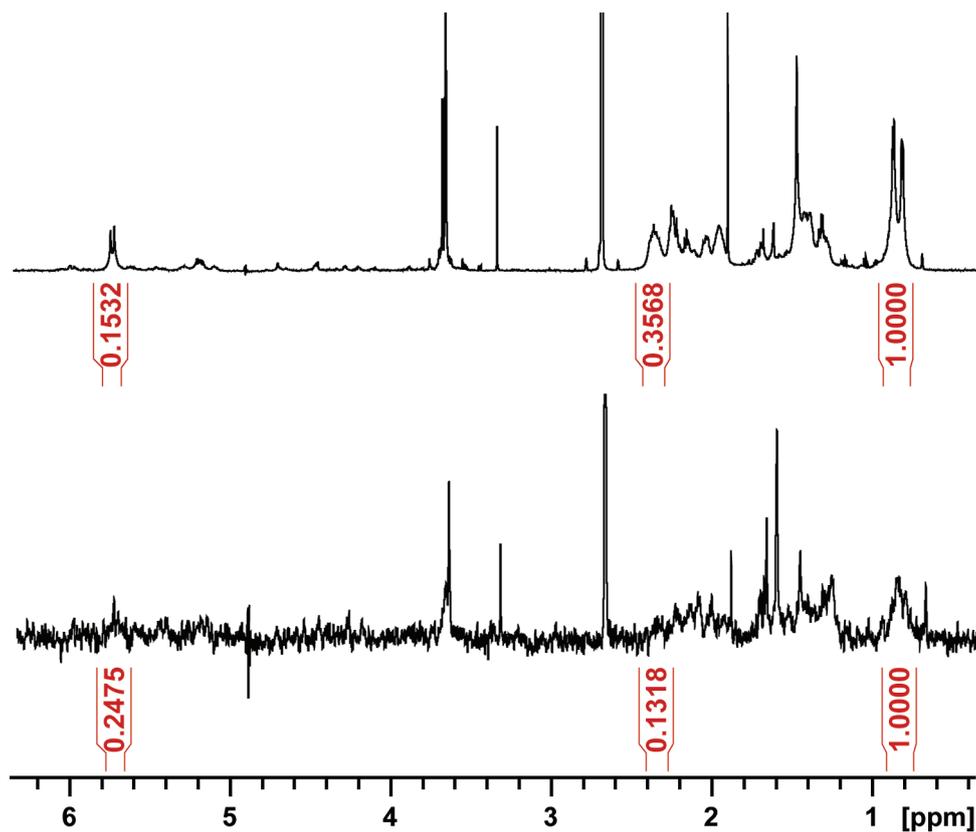


Abbildung 60: Der Vergleich der relativen Integrale von H-5, H-2/3 und H-12/13 aus dem *off*- und dem STD-Spektrum spricht für eine spezifische Wechselwirkung zwischen dem Protein und dem (+)-Germacren D.

Da für STD-Experimente kein (+)-GD zur Verfügung stand, konnten keine Experimente durchgeführt werden, um dessen spezifische Bindung an das Enzym nachzuweisen. Die Tendenz eines enzymatischen Reaktionsproduktes an das aktive Zentrum zu binden ist wohlbekannt und konnte vielfach gezeigt werden.^{54;104;105} Um dennoch abschätzen zu können, ob ein reales Bindungsepitop in dem STD-Spektrum beobachtet wird, wurden einige der Signale integriert und die relativen Intensitäten aus dem Referenz- und dem STD-Spektrum miteinander verglichen (Abbildung 60). Da sich die Verhältnisse sehr eindeutig ändern, ist eine gerichtete Bindung an das Protein wahrscheinlich. Die Inhibition des Enzyms deutet zudem auf eine Bindung im aktiven Zentrum hin.

Für die Analyse der Progresskurven wurden die Signale H-2 des FDP und H-5 des (+)-GD integriert und gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 61). Für die beiden Signale gab es keine Überlagerungen mit anderen Protonen. Die Zeit, die aufgetragen wurde, entspricht der Mitte des jeweiligen Zeitabschnittes, da jedes Spektrum das Mittel der Signalintensität über den Beobachtungszeitraum darstellt. Die Auftragung führt zu höheren Konzentrationen für das

(+)-GD als für das FDP. Dies war nach den Voruntersuchungen zu erwarten gewesen, da das FDP aufgrund der Micellbildung reduzierte Signalintensitäten zeigt. Um aus dem jeweiligen Integral die Konzentration berechnen zu können und auch für das FDP eine repräsentative Progresskurve zu erhalten, wurde die Summe der Integrale von H-2 und H-5 gebildet (Abbildung 62). Der Graph für die Summe der Integrale steigt zunächst an, durchläuft bei Minute 200 ein Maximum und fällt dann langsam wieder ab. Die Differenz im vorderen Teil des Graphen zum Maximum entspricht dem Anteil an FDP, der in den Micellen gebunden und deshalb nicht detektierbar ist. Der Abfall im hinteren Teil lässt sich wahrscheinlich auf eine geringfügige Entmischung des Germacren D aus der wässrigen Phase zurückführen. Zu Beginn des Experiments beträgt die Signalreduktion des FDP etwa 50%, was sehr gut mit der Beobachtung aus den Löslichkeitsversuchen übereinstimmt. Hieraus kann auch abgeleitet werden, dass tatsächlich der Hauptteil des Germacren D in Lösung bleibt. Der untere Teil der Abbildung zeigt die korrigierten und auf Konzentrationen umgerechneten Progresskurven der beiden Protonensignale. Diese bestätigen die hohe Umsatzrate zu Anfang der Reaktion. Bereits nach weniger als 100 min sind 50% des Substrates umgewandelt. Bis zu diesem Zeitpunkt verläuft die Konzentrationsabnahme bzw. -zunahme linear. Im zweiten Abschnitt, zwischen der 100. und 300. Minute nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit immer stärker ab, ab der 300. Minute ist kaum noch ein Umsatz zu verzeichnen.

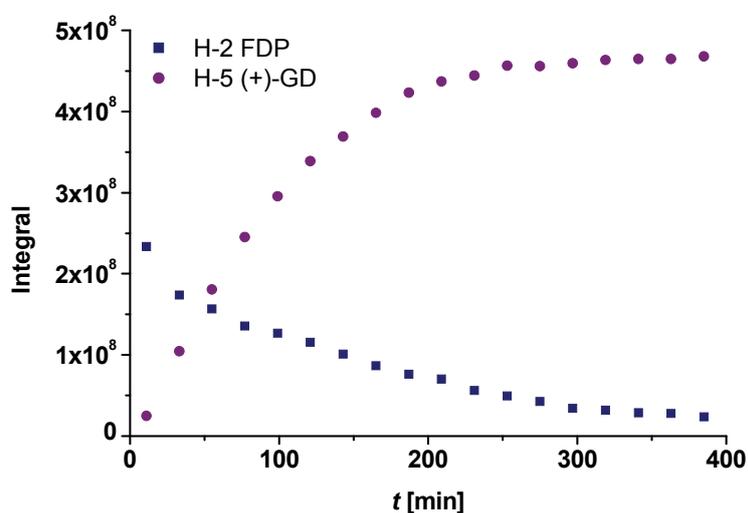


Abbildung 61: Zeitdiagramm für den Verlauf der Integrale der Protonen H-2 des Farnesyldiphosphats und H-5 des (+)-Germacren D in den *off-resonance* Spektren. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen aus den Voruntersuchungen sind die Signalintensitäten des FDP aufgrund der Micellbildung reduziert. Es entsteht scheinbar mehr Produkt, als Substrat eingesetzt worden ist. Für die Darstellung des Konzentrations-Zeit-Verlaufs muss deshalb erst eine Korrektur durchgeführt werden.

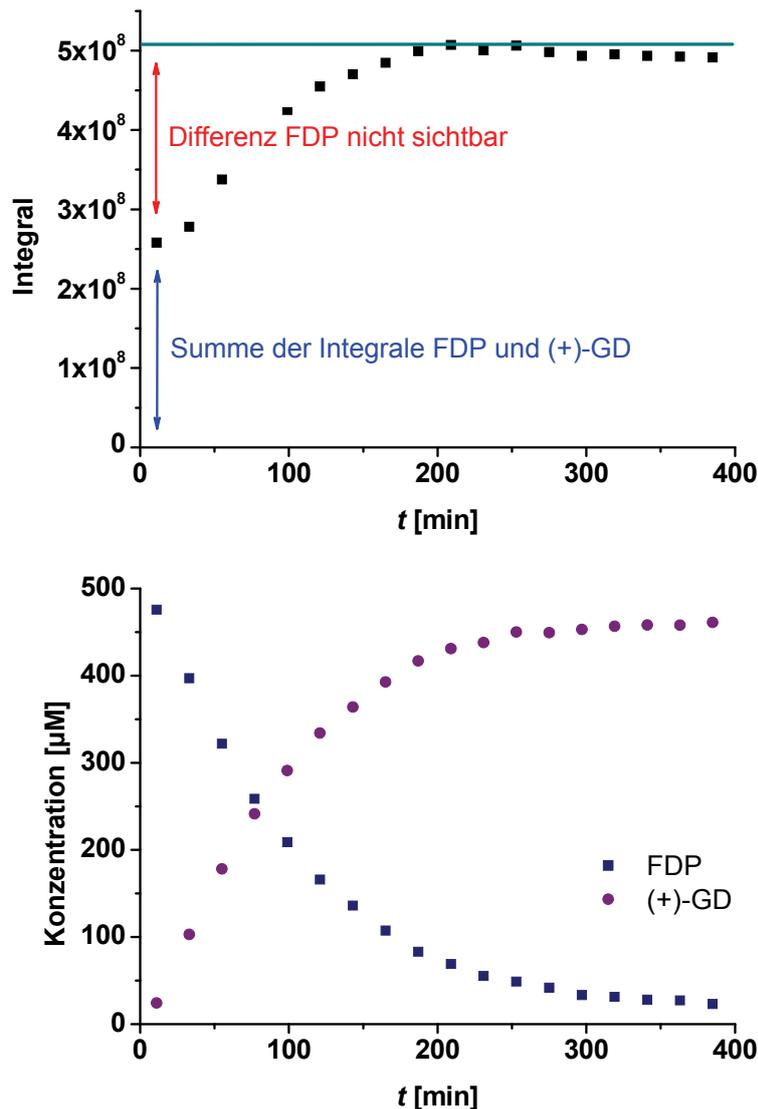


Abbildung 62: Konzentrations-Zeit-Verlauf für die Enzymreaktion der (+)-Germacren D Synthese. Oben: Summe der Integrale von H-2 (FDP) und H-5 ((+)-GD). Aufgrund der Micellbildung wird ein Teil des FDP NMR-spektroskopisch nicht detektiert. Unten: Auftragung der korrigierten Konzentration von H-2 entsprechend dem oberen Teil der Abbildung.

Nach Anpassung der Konzentrationen kann jetzt ein *fit* der Datenpunkte mit Hilfe der Lambert W Funktion (Gleichung 10, S. 32) durchgeführt werden, um Werte für V'_{\max} und K'_M zu erhalten. Hierfür wurde das Programm R mit den im Anhang angegebenen Skripten verwendet (vgl. S. 218). Abbildung 63 zeigt das Ergebnis des *fits*. Für V'_{\max} ergibt sich ein Wert von 912 $\mu\text{M}/\text{h}$ (253 nM/s), was bei der eingesetzten Proteinkonzentration von 2.5 μM einen k_{cat} von 0.101 s^{-1} ergibt. Dieser Wert liegt um einen Faktor fünf höher als der in der Literatur angegebene, ist aber immer noch deutlich niedriger als die mittels SPR bestimmte Dissoziationsrate. Für die apparente Michaelis-Menten-Konstante K'_M ergibt sich ein Wert

von 1.42 mM. Dieser Wert liegt um einen Faktor drei höher, als die Dissoziationskonstante $K_D = 567 \mu\text{M}$ des FMP bei gleicher MgCl_2 -Konzentration. Auffällig ist, dass bei der eingesetzten Ausgangskonzentration an FDP der Umsatz für den Beobachtungszeitraum deutlich langsamer verläuft als V'_{max} . Aufgrund des hohen Wertes von K'_M verläuft die Reaktion unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nicht unter Substratsättigung.

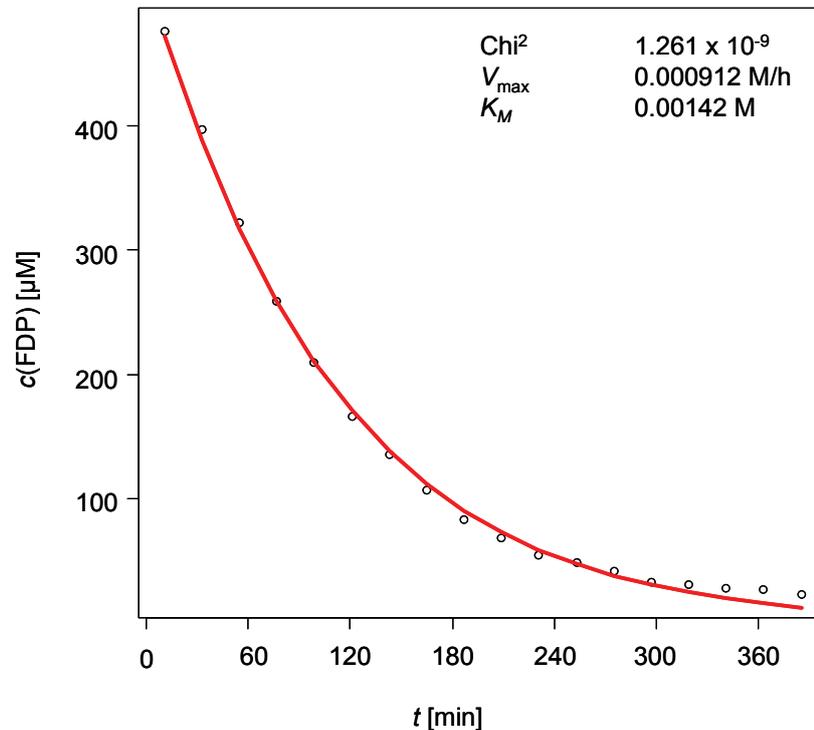


Abbildung 63: Konzentrations-Zeit-Verlauf für die Enzymreaktion der (+)-Germacren D Synthase und *fit* nach Gleichung 10.

Um den *fit* zu überprüfen, wurde eine zweite Methode der Auswertung gewählt. Unter der Annahme, dass die Reaktionsgeschwindigkeit für die einzelnen Zeitabschnitte konstant ist, wurden die Differenzen der Substratkonzentrationen $\Delta[S]$ und des Reaktionsverlaufes $\Delta[t]$ zwischen den jeweilig benachbarten Datenpunkten aus Abbildung 63 gebildet. Daraus wurden die Geschwindigkeiten v nach $\Delta[S]/\Delta[t]$ berechnet und gegen das Mittel von $[S]$ für den jeweiligen Abschnitt aufgetragen (Abbildung 64). Die Reaktionsgeschwindigkeiten, die erhalten wurden, stellen so zwar nur eine grobe Näherung dar, der Ansatz sollte aber ausreichen, um die Anpassung der Daten an die Lambert W Funktion zu überprüfen. Der *fit* in Abbildung 64 erfolgte nach der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 7, S. 30) und lieferte Werte von 1.36 mM/h (378 nM/s) für V'_{max} und 2.15 mM für K'_M . Die Werte liegen somit in derselben Größenordnung, wie die Auswertung nach Lambert W ergibt.

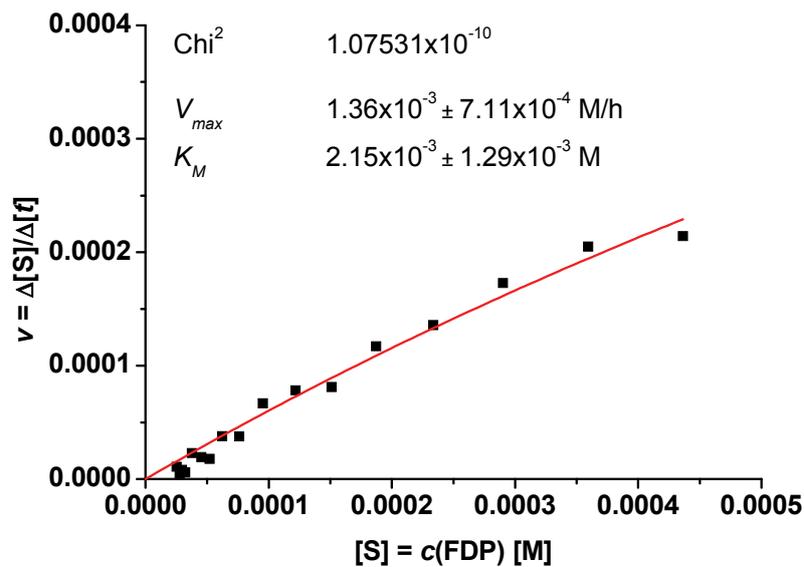


Abbildung 64: Michaelis-Menten-Plot für die Enzymreaktion der (+)-Germacren D Synthase und *fit* nach Gleichung 7. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden unter der Annahme erhalten, dass sie für die jeden Zeitabschnitt näherungsweise konstant sind. Aufgetragen wurde gegen das Mittel der FDP Konzentration des jeweiligen Abschnittes.

Für die weitere Untersuchung der Enzymreaktion der (+)-Germacren D Synthase wurden vier Proben unter veränderten Bedingungen angesetzt. In dem vorherigen Experiment betrug der Anteil der Artefakte etwa 50% an der Intensität der STD-Signale. Aufgrund des hohen Anteils an Micellen in der Lösung kann nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne FDP-Moleküle mehrfach durch das Protein und die Micellen gesättigt werden und deshalb das Bindungsepitop nicht ausschließlich die Bindung an das Enzym repräsentiert. Die verlängerte Sättigungszeit von 3 s gegenüber den Titrationsexperimenten mit dem FMP begünstigt diesen Effekt. Deshalb wurden vier Proben mit einer Ausgangskonzentration von 154.8 μM FDP und 1.25 μM Enzym angesetzt. Das entspricht einem 125-fachen Substratüberschuss. DMSO- d_6 wurde den Proben nicht zugesetzt, da dieses die Micellbildung fördert. Die Proben unterschieden sich durch die Konzentration der Magnesiumionen (0.1, 0.2, 0.5 und 1.0 mM), die dem Puffer zugesetzt wurden. Der Ansatz entspricht den Artefaktmessungen aus Tabelle 9 (S. 65). Die Sättigungsleistung wurde auf 35 dB erhöht, die Sättigungszeit auf 2 s verringert.

Für die ersten drei Proben (0.2, 0.5 und 1.0 mM MgCl_2) wurden 128 *scans* pro Inkrement und 12 *averaging cycles* (L4) angesetzt. Aufgrund der verkürzten Sättigungszeit betrug die Zeit pro Spektrensatz ~ 15 min (Summe aus *on-* und *off-resonance* Spektrum) und die Gesamtzeit des Experiments rund 3 h. Für die Probe mit dem 0.1 mM MgCl_2 -haltigen Puffer wurde die Zahl der *scans* auf 256 und L4 auf 16 erhöht. Die Zeit pro Spektrensatz hat sich damit auf

~30 min verdoppelt, die Gesamtzeit des Experiments betrug rund 8 h. Die Spektren, die aufgezeichnet wurden, dokumentieren den Verlauf der Enzymreaktionen (ohne Abbildung). Im Gegensatz zu dem vorhergehenden Experiment zeigen die Spektren keine Produktsignale, was auf den fehlenden Anteil an DMSO im Puffer zurückzuführen ist. Für die Auswertung der Spektren stehen also nur die Substratsignale zur Verfügung. Um den Konzentrations-Zeit-Verlauf der jeweiligen Experimente darstellen zu können, wurde eine Korrektur für die Integrale der Substratsignale durchgeführt. Hierfür wurde angenommen, dass die Integrale bis zu einer Konzentration von 65 μM stimmen. Danach werden reduzierte Signalintensitäten beobachtet. Durch Extrapolation können Eichgeraden generiert werden, mit denen sich die Sollintegrale zurückrechnen lassen (Abbildung 65).

Eine Auswertung der Daten nach der Lambert W Funktion (Gleichung 10) konnte nicht durchgeführt werden, da die *fits* in den meisten Fällen konvergierten, also unendlich viele Wertepaare generierten, welche die Funktion erfüllen. Auch durch die Berechnung der Geschwindigkeiten für die einzelnen Zeitabschnitte und *fit* nach Michaelis-Menten konnten keine Werte für V'_{max} und K'_M erhalten werden. Der Grund liegt in der Ausgangskonzentration, die niedrig gewählt wurde um das Auftreten von Micellen zu unterdrücken. In Abbildung 66 ist der Konzentrations-Zeit-Verlauf für die durchgeführten Experimente dargestellt. Dabei zeigt sich für die Konzentration der Magnesiumionen ein starker Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit der (+)-GDS. Für die Probe mit 1 mM MgCl_2 liegt K'_M bereits im milimolaren Bereich, für die Proben mit den verringerten Mengen an MgCl_2 wird K'_M noch höher liegen. Für den Michaelis-Menten-Plot (v gegen $[S]$) liegen die Datenpunkte damit in dem vorderen linearen Bereich des Graphen, der nicht gefittet werden kann.

In erster Näherung und bei großen Substratüberschüssen gehorchen Enzymreaktionen einer Kinetik erster Ordnung. Deshalb wurde ein *fit* der Datenpunkte aus Abbildung 66 auf eine Exponentialfunktion der Form $[S] = [S]_0 \exp(-kt)$ durchgeführt. Für die Umsetzung des FDP wurden die folgenden Geschwindigkeitskonstanten erhalten: $k = 2.5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (1 mM MgCl_2), $1.7 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ (0.5 mM MgCl_2), $4.9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (0.2 mM MgCl_2) und $2.7 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ (0.1 mM MgCl_2). Diese Zeitkonstanten erlauben zwar keine Abschätzung für V'_{max} und K'_M , zeigen aber die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit auf. Bis zu einer MgCl_2 -Konzentration von 0.5 mM nimmt die Geschwindigkeitskonstante gegenüber der Konzentration von 0.1 mM um einen Faktor von 6.3 zu. Bei weiterer Verdopplung der MgCl_2 -Konzentration steigt der

Faktor auf 9.3. Eine ähnliche Abhängigkeit ist für die Reaktionsgeschwindigkeit einer β -Farnesen Synthase berichtet worden.⁸⁴

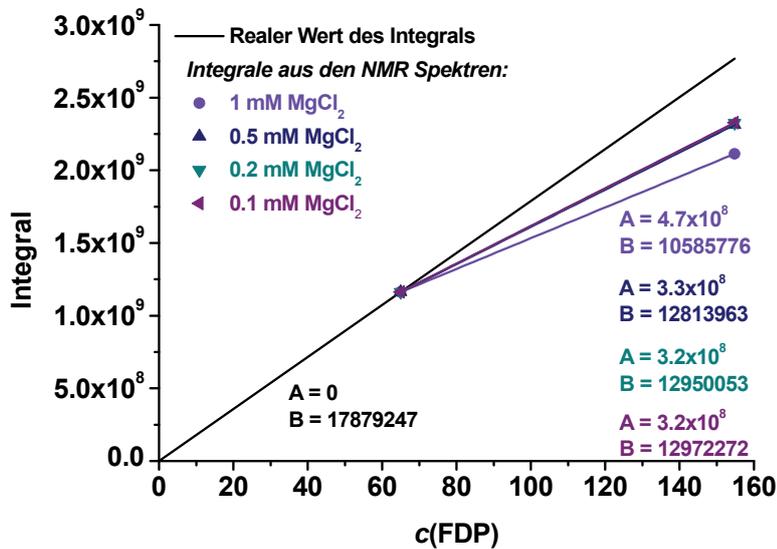


Abbildung 65: Schema zur Korrektur der Integrale in den gemessenen NMR-Spektren. Bis zu einer FDP-Konzentration von 65 μM repräsentieren die gemessenen Integrale die tatsächliche Konzentration. Danach tritt die Micellbildung ein und die Integrale fallen niedriger aus.

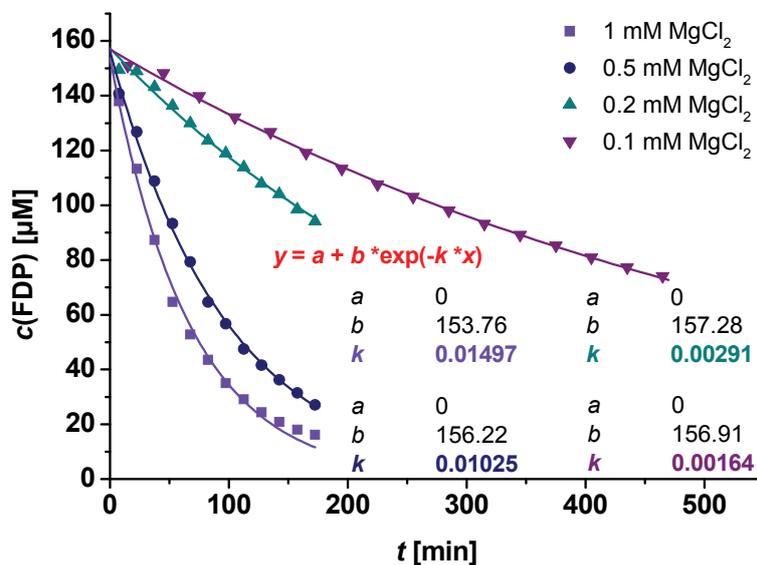


Abbildung 66: Konzentrations-Zeit-Verlauf für die Reaktion der (+)-GDS mit FDP in $dTBS$ bei verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen.

Leider war für dieses Substrat-Enzym-System eine ausführliche kinetische Analyse im untersuchten Konzentrationsbereich nicht möglich. Auch eine Analyse bezüglich einer möglichen Produktinhibition konnte nicht durchgeführt werden. Abbildung 67 zeigt den

Reaktionsverlauf für die beiden beschriebenen Ansätze bei gleicher MgCl_2 -Konzentration, einmal mit und einmal ohne Zusatz von $\text{DMSO-}d_6$ im Puffer. Es sind nur die Datenpunkte aufgetragen, die im gleichen Konzentrationsbereich liegen. Man sieht einen deutlich schnelleren Umsatz für den zweiten Ansatz (blau), bei dem kein $\text{DMSO-}d_6$ zugesetzt war und das (+)-Germacren D nicht in Lösung geblieben ist. Dies könnte als Hinweis für eine Produktinhibition im ersten Ansatz interpretiert werden. Da Substrat und Produkt um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren, ist die Produktinhibition notwendigerweise kompetitiv. Die Auswirkung wäre eine Erhöhung der Michaelis-Menten-Konstante bei gleichbleibendem V_{\max} . Die Produktinhibition würde den Unterschied des $K_D = 567 \mu\text{M}$ für das FMP und $K'_M = 1.42 \text{ mM}$ für das FDP gut erklären. Allerdings muss für diesen Vergleich angemerkt werden, dass die Enzymproben aus unterschiedlichen Expressionsansätzen stammen und die Enzymkonzentrationen nicht gleich sind.

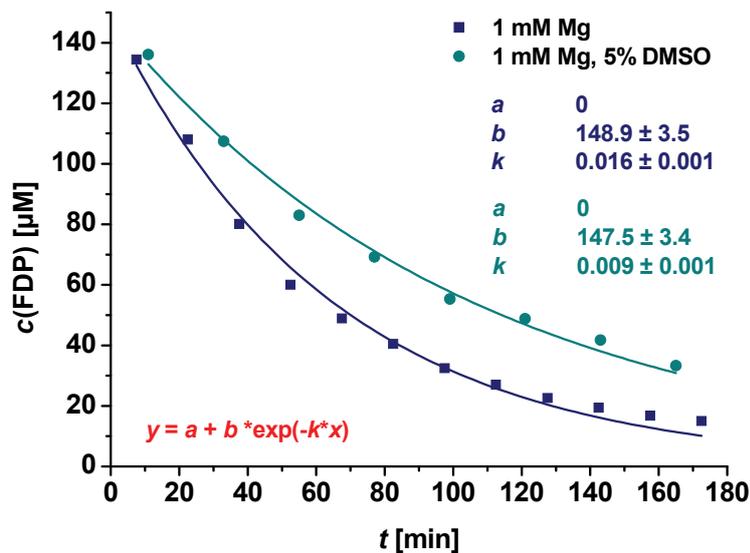


Abbildung 67: Vergleich der Reaktionsgeschwindigkeiten für die beiden unterschiedlich gewählten Ansätze bei gleicher MgCl_2 -Konzentration. Die ausgewählten Datenpunkte liegen im gleichen Konzentrationsbereich, die Zeiten wurden einander angepasst. Ansatz 1 (rot): 1 mM MgCl_2 , 5% $\text{DMSO-}d_6$, $[\text{S}]_0 = 500 \mu\text{M}$, $[\text{E}]_0 = 2.5 \mu\text{M}$. Ansatz 2 (blau): 1 mM MgCl_2 , $[\text{S}]_0 = 157 \mu\text{M}$, $[\text{E}]_0 = 2.5 \mu\text{M}$.

Für die FDP Probe, die mit 0.1 mM MgCl_2 versetzt wurde, ist der zeitliche Verlauf der Signalintensitäten in den STD-Differenzspektren in Abbildung 68 gezeigt. Diese steigen jetzt mit fortschreitender Reaktionszeit an. Die Micellbildung spielte für die Vermessung dieser Probe nur noch eine untergeordnete Rolle, so dass davon ausgegangen werden kann, dass das Bindungsepitop ausschließlich die Wechselwirkung mit dem Enzym repräsentiert.

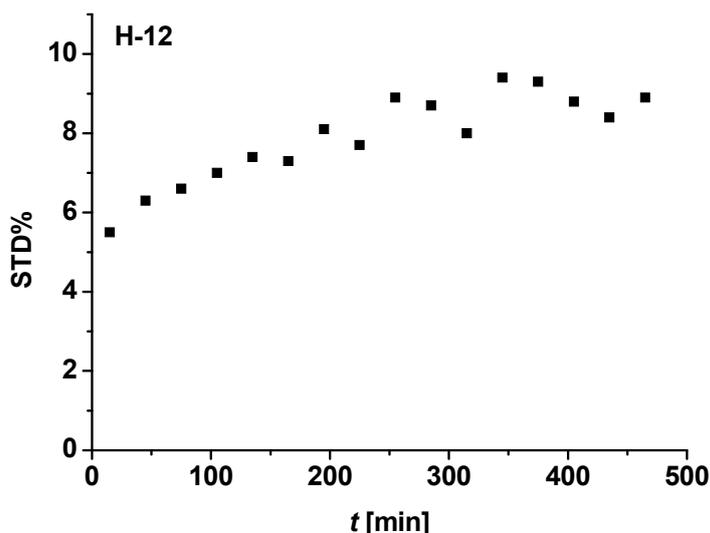


Abbildung 68: Verlauf der STD-Intensitäten in Abhängigkeit von der Zeit für die H-12 Methylprotonen von FDP, gezeigt für die Probe in *d*TBS mit 0.1 mM MgCl₂. Die STD-Intensitäten fallen insgesamt um einen Faktor 2-3 geringer aus als für die Probe im Ansatz 1. Die Intensitäten der Artefaktsignale liegen für die Methylgruppen im Bereich von 0.2-1.2% (vgl. Tabelle 9, S. 65). Mit fortschreitender Zeit, also sinkender FDP-Konzentration, steigen die STD-Intensitäten jetzt an. Die Bildung von Micellen spielt nur noch eine untergeordnete Rolle.

In diesem Abschnitt wurde ein neues Experiment vorgestellt, mit dem Enzymreaktionen verfolgt und gleichzeitig Daten über die Substratbindung mit atomarer Auflösung erhalten werden können. Die Methode eignet sich vor allem für die Untersuchung von Ein-Substrat-Enzymen, bei denen sich Bindungsstudien nur unter Bedingungen der laufenden Reaktion durchführen lassen. Für das Experiment wurde ein bestehendes Bruker-Pulsprogramm dahingehend modifiziert, dass eine Serie von STD-Spektren in inkrementierten Zeitabschnitten aufgezeichnet wird. Dabei konnte das Bindungsepitop des Substrates aufgeklärt werden, gleichzeitig lies sich der Reaktionsumsatz NMR-spektroskopisch verfolgen. Die fortschreitende Reaktion zeigt, dass das Enzym in seiner bioaktiven Konformation vorliegt und dass die beobachtbare Bindung weitgehend spezifischer Natur ist. Ferner konnte gezeigt werden, dass sich die einzelnen FIDs nachträglich aufaddieren lassen, so dass das *S/N*-Verhältnis zusätzlich optimiert werden kann. Die Reaktionsverfolgung ermöglicht weiterhin die Auswertung der Progresskurven (Konzentrations-Zeit-Verlauf) und damit die Erhebung enzymkinetischer Parameter. Für das untersuchte System ergaben sich zwar Probleme aufgrund des Löslichkeitsverhaltens des untersuchten Substrats, eine Analyse der Progresskurven sollte aber bei anderen Protein-Ligand-Systemen besser durchführbar sein.

Die hier vorgestellte Variante des STD-Experiments stellt jedoch einige Rahmenbedingung an das zu untersuchende Enzym, die sicherlich eine Einschränkung der Methode darstellt. Damit überhaupt ein STD-Effekt auftreten kann, muss die Zeitkonstante der Dissoziationsreaktion k_{-1} groß gegenüber der Zeitkonstante des Umsatzes k_2 sein. Um einen ausreichenden Durchsatz an gebundenen Molekülen zu erreichen, müssen weiterhin die Bedingungen eines schnellen Austausches zwischen dem gebundenen und dem freien Zustand des Substrates erfüllt sein. Nur unter diesen Bedingungen kann ein STD-Effekt detektiert werden. Ein Vorteil ist ein generell langsamer Reaktionsumsatz, damit genügend Zeit für die Aufnahme der Spektren zur Verfügung steht. Die Tatsache, dass FIDs von mehreren aufeinander folgenden Zeitabschnitten nachträglich aufaddiert werden können, verschafft wiederum ein wenig Flexibilität bei der Gestaltung des Experiments. Weiterhin kann durch die Anpassung von Reaktionsparametern, wie z.B. der Temperatur, Einfluss auf die Umsatzgeschwindigkeit genommen werden, wodurch die Flexibilität weiter erhöht werden kann.

4.5.3 Vergleich der Bindungsepitope: Farnesylmono- und Farnesyldiphosphat

In Abbildung 69 sind die Bindungsepitope für das Farnesylmonophosphat und für das Farnesyldiphosphat gegenübergestellt. Alle Bindungsepitope der Farnesylphosphate mit der (+)-Germacon D Synthase, die im Laufe dieser Arbeit ermittelt wurden, weisen eine hohe Ähnlichkeit auf. Die in der Abbildung dargestellten wurden bei einer Magnesiumkonzentration von 10 mM für das FMP und 0.1 mM für das FDP erhalten. Die höchsten STD-Intensitäten werden in beiden Fällen für die Methyl- und Olefinprotonen erhalten, insbesondere H-2, H-6, H-10, H-13 und H-14. Die Werte für die relativen STD-Intensitäten der Olefinprotonen schwanken, wie bereits die bisher präsentierten Daten gezeigt haben, am deutlichsten. Die geringsten Intensitäten werden in beiden Molekülen auf den Methylenprotonen gemessen (H-1, H-4, H-5, H-8, H-9). Diese Übereinstimmung zeigt sich, obwohl zwei unterschiedliche Moleküle bei Magnesiumkonzentrationen, die sich um zwei Größenordnungen unterscheiden, verglichen werden. Das Ergebnis verdeutlicht noch einmal, dass die Magnesiumionen keinen Einfluss auf den Bindungsmodus der Farnesylphosphate besitzen. Der Einfluss zeigt sich vielmehr bei der Bindungskonstante und durch eine entsprechend verringerte Rate bei der enzymatischen Umsetzung des Substrats.

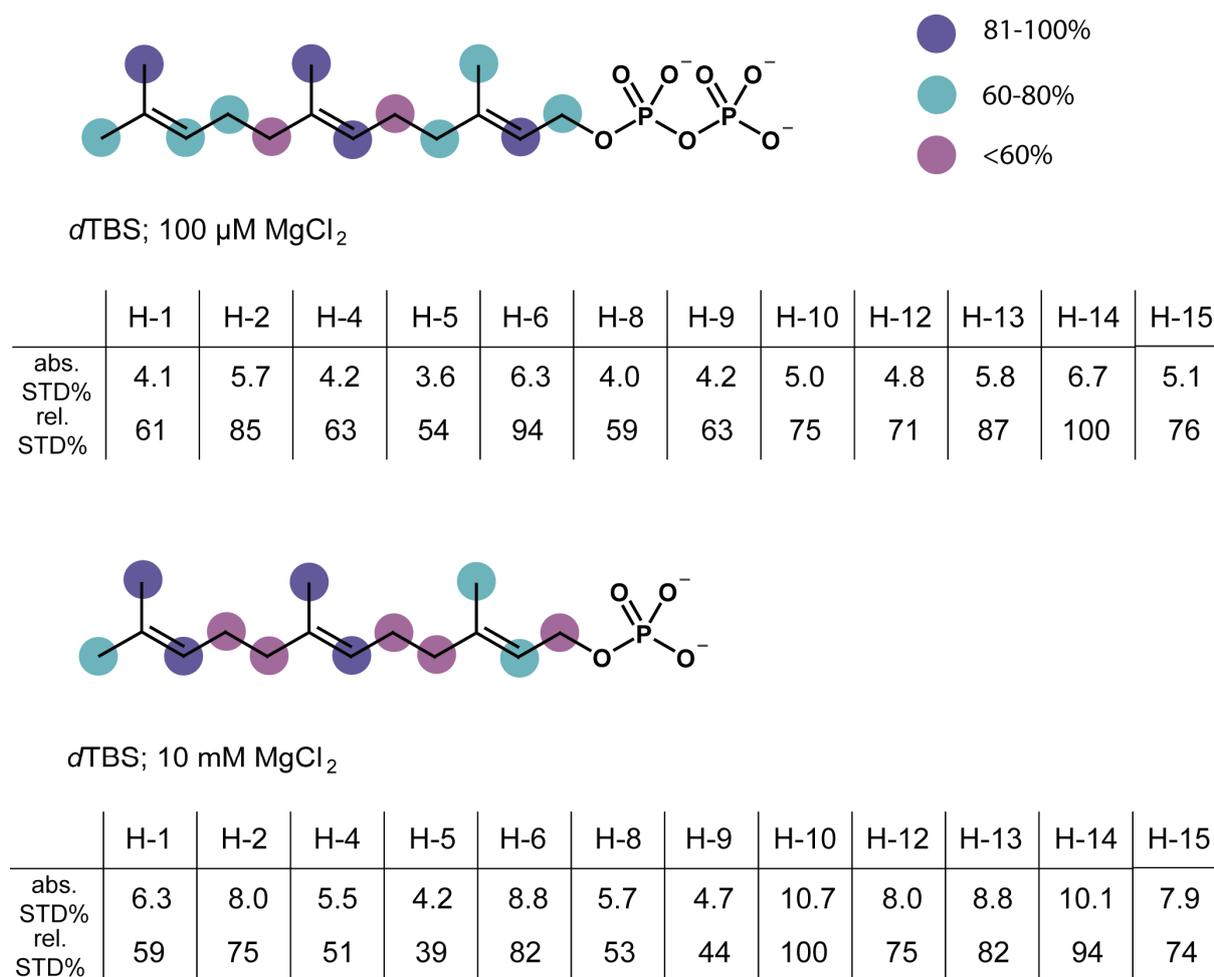


Abbildung 69: Vergleich der Bindungsepitope von Farnesylmono- und Farnesyldiphosphat in δ TBS. Das Magnesium besitzt einen Einfluss auf den Durchsatz an gesättigten Ligandmolekülen im STD-Experiment, wodurch die absoluten STD-Intensitäten variieren. Dagegen bleibt das relative Bindungsepitop auch bei variierender $MgCl_2$ -Konzentration konstant.

4.6 Bindungsstudien an der Farnesyltransferase

An der enzymatischen Umsetzung von Farnesyldiphosphat durch die (+)-Germacren D Synthase konnte ein Experiment entwickelt werden, dass simultan Informationen über die Substratbindung und über die kinetischen Parameter der Umsetzung liefert. Mit der Farnesyltransferase sollte das Konzept an einem zweiten Enzym getestet werden. In eukariotischen Zellen katalysiert die FTase die Übertragung einer Farnesyleinheit auf die Cysteineinheit von Proteinen mit einem C-terminalen CAAX-Motiv. Die Farnesyleinheit dient als Lipidanker, der eine Fixierung des Zielproteins in der Zellmembran ermöglicht. Zu den Substraten der FTase zählen vor allem Mitglieder der Superfamilie der kleinen G-Proteine, die bei vielen Signaltransduktions-Prozessen eine wichtige Rolle spielen.

Bestimmte Mutationen können bei diesen Proteinen einen dauerhaft aktiven Zustand auslösen, der zu unkontrolliertem Zellwachstum und in der Folge zu einer Krebserkrankung führt. Die indirekte Inaktivierung mutierter Formen der CAAX-Proteine durch Inhibition der Farnesylierungsreaktion stellt ein Gebiet intensiver Forschung in der Krebstherapie dar.

Im Gegensatz zur (+)-GDS benötigt die FTase zwei Substrate. Im ersten Schritt bindet das Enzym Farnesyldiphosphat in einer tiefen hydrophoben Tasche. Mit dem FDP wird ein zweiwertiges Kation, Magnesium oder Mangan, aufgenommen, das an die Diphosphatgruppe koordiniert. Eine zweite Bindungstasche bindet das C-terminale CAAX-Motiv des Zielproteins. Die Erkennung durch die FTase wird hauptsächlich durch den terminalen X-Rest vermittelt. Die Thiolgruppe des Cysteins koordiniert an ein Zinkion, das in einer festen Bindungsstelle in der FTase sitzt. Dieses erhöht die Nucleophilie des Schwefels, wodurch ein Angriff auf das C1-Atom der Farnesyleinheit erleichtert wird. Im Gegensatz zu dem zweiwertigen Kation, das die Bindung und Abspaltung der Diphosphatgruppe unterstützt, ist das Zinkion für die Enzymreaktion der FTase essentiell.

Der Mechanismus der FTase ist intensiv untersucht worden. Hauptsächlich wurden biochemische Assays bezüglich der Bindungskinetik und röntgenkristallographische Methoden angewandt. Die Proteinkomponente kann gegen beliebig lange Peptide ersetzt werden, wobei auch die tetrameren CAAX-Sequenzen umgesetzt werden. Kristallstrukturen mit jeweils einem der beiden Substrate, mit dem Produkt, oder mit dem Produkt und einem Molekül FDP haben einen detaillierten Einblick in den Reaktionsmechanismus gegeben. Die kinetischen Daten untermauern den oben beschriebenen sequentiellen Bindungsmechanismus.^{43;106}

Die Mitglieder der Ras-Familie zählen zu den am intensivsten untersuchten Zielproteinen der FTase. Sie umfasst vier 21 kDa Proteine, das H-Ras, K-Ras4A, K-Ras4B und N-Ras, die durch die drei H-, K- und N-*ras* Gene kodiert werden. Das K-*ras* Gen kodiert die nur im C-Terminus unterschiedlichen K-Ras4A und K-Ras4B (Abbildung 70).¹⁰⁷ Aktivierende Mutationen treten bei 20-30% aller Krebsarten auf. Nach der Farnesylierung des C-terminalen Cysteinrestes sind die Ras-Proteine weiteren Modifizierungen ausgesetzt. Zunächst wird die AAX-Sequenz durch eine Peptidase abgespalten und die Carboxylfunktion des nun terminalen Cysteins methyliert. In der Folge werden 1-2 weitere Cysteinreste nahe dem C-Terminus durch Palmitoylreste modifiziert. Die Palmitoylierung ist aber, im Gegensatz zur Farnesylierung, für die Membranverankerung und die Funktion der Ras-Proteine nicht

essentiell. Mutierte Formen von K-Ras4B treten bei Krebserkrankungen besonders häufig in Erscheinung. Sie werden bei Darmkrebs (45%), Lungenkrebs (35%) und bei Pankreastumoren (90%) gefunden. Eine Besonderheit von K-Ras4B ist, dass es nicht wie die drei anderen Formen palmitoyliert wird, sondern eine stark positiv geladene Lysin-reiche Sequenz in der Nähe der CAAX-Box besitzt. Diese verstärkt die Lipidverankerung durch ionische Wechselwirkung mit der negativ geladenen Membranoberfläche. Außerdem kann K-Ras4B alternativ durch die Geranylgeranyltransferase (GGTase I) prenyliert werden, so dass die Inhibition der FTase nicht zu dessen Inaktivierung führt.⁴²

| | |
|---------|---|
| H-Ras | ¹⁶⁶ H K L R K L N P P D E S G P G C M S C K C V L S ¹⁸⁹ |
| K-Ras4A | ¹⁶⁶ Y R L K K I S K E E K T P G C V K I K K C I I M ¹⁸⁹ |
| K-Ras4B | ¹⁶⁶ H K E K M S K D G K K K K K S K T K C V I M ¹⁸⁸ |
| N-Ras | ¹⁶⁶ Y R M K K L N S S D D G T Q G C M G L P C V V M ¹⁸⁹ |

Abbildung 70: C-terminale Sequenz der vier Ras-Proteine mit der jeweiligen CAAX-Box. Im Gegensatz zu den Proteine H-Ras, N-Ras und K-Ras4A, die für eine Palmitoylierung weitere C-terminale Cysteinreste besitzen, zeichnet sich der C-Terminus von K-Ras4B durch eine Lysinreiche Sequenz aus.

Für die Untersuchung der Farnesylierungsreaktion durch die FTase wurde die ¹⁸²KTKCVIM¹⁸⁸-Peptidsequenz aus dem K-Ras4B als Zielsequenz ausgewählt (Abbildung 71). Gegenüber der ¹⁸⁵CVIM¹⁸⁸-Sequenz ist für das Heptapeptid eine deutlich höhere Löslichkeit zu erwarten. Die Synthese des Peptids erfolgte an der festen Phase vom C- zum N-Terminus nach der Fmoc-Schutzgruppenstrategie.¹⁰⁸ Nach Abspaltung der Seitenkettenschutzgruppen unter Schutzgas musste zügig gearbeitet werden, um eine Dimerisierung des Peptids durch oxidative Bildung von Disulfidbrücken zu verhindern. Die Reinigung des Produktes erfolgte mittels RP-HPLC und die Identifizierung der von der Säule eluierten Produkte mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Es wurden 12.6 mg (15.3 µmol) des aufgereinigten Peptids erhalten, entsprechend einer Ausbeute von 31% (80-85% pro Syntheseschritt). Die Charakterisierung erfolgte mit Hilfe von 2D-NMR-Experimenten in H₂O/D₂O (10:1, pH 3.8, H,H-TOCSY und H,H-ROESY). Die Zuordnung der Protonenresonanzen des NH-Bereiches ist in Abbildung 72 dargestellt.

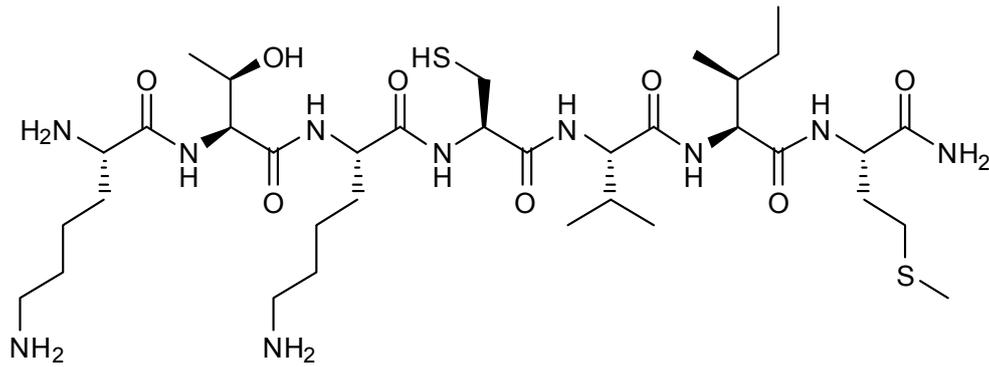


Abbildung 71: Struktur des in dieser Arbeit synthetisierten Peptids $^{182}\text{KTKCVIM}^{188}$.

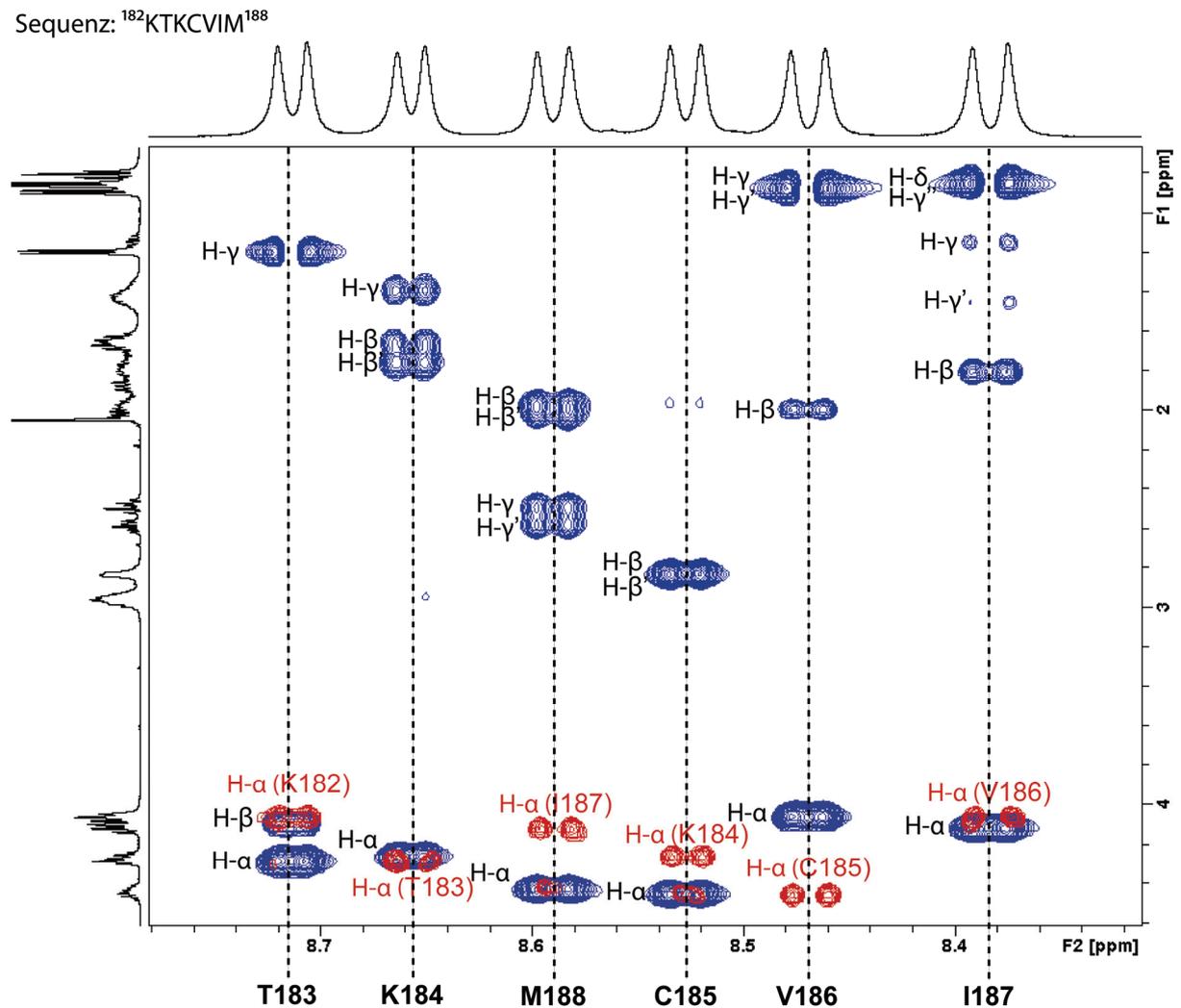


Abbildung 72: Blau: NH-Bereich des TOCSY-Spektrums von $^{182}\text{KTKCVIM}^{188}$. Rot: ROESY-Spektrum (500 MHz, 300 K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3.8). Aufnahmebedingungen: Tabelle 45, S. 156.

25 μL einer käuflich erworbenen FTase-Lösung (1 mg/mL in 100 mM HEPES-Puffer) wurde mittels Dialyse in *d*TBS umgepuffert. In einem ersten Versuch wurde der Puffer aus den STD-Experimenten mit der (+)-GDS verwendet (50 mM Tris-HCl-*d*₁₁, 300 mM NaCl, 20 mM NaN₃). Die Ausbeute betrug ca. 80%. Zunächst wurde das Protein für Sättigungsexperimente eingesetzt. Ein zufrieden stellendes Ergebnis wurde mit ca. 35% Sättigung bei einem Einstrahlpunkt von -1 ppm und einer Einstrahlleistung von 35 dB für 2 s erreicht. Artefaktmessungen mit dem Peptid in einer Konzentration von 100 μM in *d*TBS (0.1 mM MgCl₂) zeigten keine STD-Signale. Bei Zugabe des Peptids (80 μM) zu einer 100 μM FDP-Lösung in *d*TBS (0.1 mM MgCl₂) wurde eine Erhöhung der FDP-Intensitäten in dem STD-Spektrum um eine Faktor von 4-5 beobachtet, so dass Artefaktssignale im Bereich von 2-5 STD% auftraten. STD-Intensitäten für die Methylgruppen des Peptids lagen im Bereich von 0.7-2%.

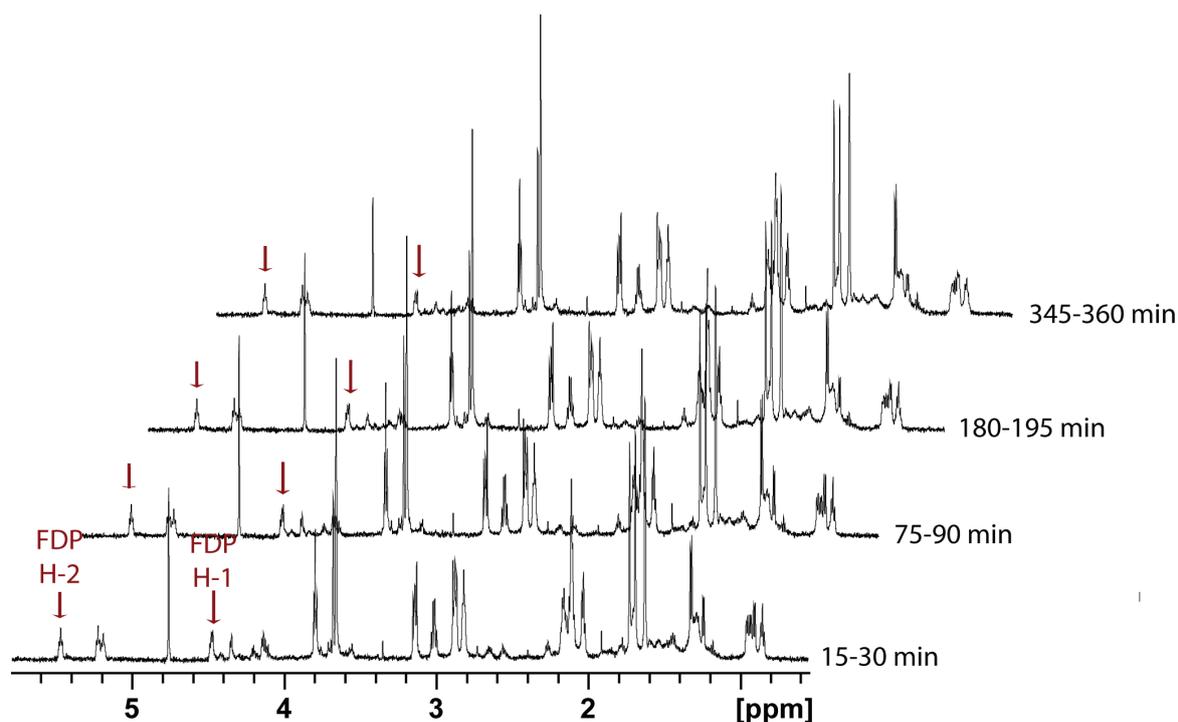


Abbildung 73: Spektren für verschiedenen Zeitabschnitte, die den Reaktionsverlauf der FTase dokumentieren sollen. Die Signale der H-1- und H-2-Protonen wurden markiert, da für diese die eindeutigste Änderung bei einem Substratumsatz zu erwarten gewesen wäre. Die Spektren bleiben über den gesamten Beobachtungszeitraum identisch, zeigen also keinen Umsatz. Aufnahmebedingungen: Tabelle 89, S. 179.

Um den Reaktionsverlauf der FTase zu dokumentieren wurde ein STD-Experiment mit dem Pulsprogramm *stdiffesgp2d.th* und dem *loop*-Parameter $L4 = 24$ aufgesetzt. Jedes Einzelexperiment wurde mit 128 *scans* und 28k Datenpunkten aufgenommen. Das

Zeitintervall für ein STD-Experiment betrug 15 min. Als wichtigster Indikator für einen fortschreitenden Reaktionsverlauf diente das Signal der H-1 Methylenprotonen der Farnesyleinheit. Durch die Bildung des Thioethers bei Übertragung auf die Cysteinseitenkette wäre ein *shift* von 4.47 ppm in den Bereich zwischen 2-3 ppm zu erwarten gewesen. Nach Zufügen von FDP und dem Peptid $^{182}\text{KTKCVIM}^{188}$ zu der FTase-Lösung konnte kein Umsatz festgestellt werden. Abbildung 73 zeigt vier der ^1H -NMR-Spektren, die nach 30, 90, 195 und 360 min erhalten wurden. Die H-1 und H-2 Protonensignale des FDP sind in den Spektren markiert. Über einen Zeitraum von sechs Stunden zeigt das Spektrum nur geringfügige Veränderungen. Für das k_{cat} der FTase findet man in der Literatur Werte zwischen 10 und 0.01 s^{-1} je nach Reaktionsbedingungen und Peptid. Somit wurde eine Umsatzrate erwartet, die mindestens in derselben Größenordnung wie die der (+)-GDS liegen müsste. Auch eine nachträgliche Erhöhung der Magnesiumkonzentration führte zu keiner sichtbaren Veränderung in den Spektren. Für Magnesiumkonzentrationen im milimolaren Bereich wird eine Steigerung der Umsatzrate um das 700-fache berichtet. Abbildung 74 zeigt den Bereich zwischen 2 und 3 ppm nach 30 und nach 360 min, der ebenfalls keine Veränderung aufweist. Aufgrund des fehlenden Reaktionsumsatzes wurde auf eine Auswertung der STD-Spektren verzichtet.

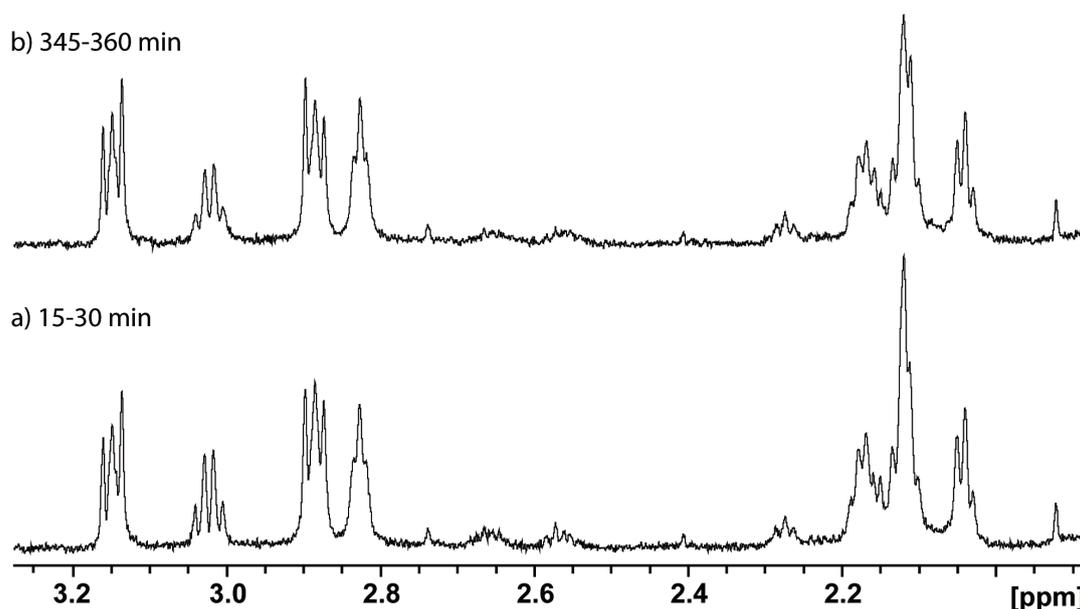


Abbildung 74: Ausschnitt aus den ^1H -Referenzspektren für die Signale zwischen 2 und 3 ppm des zweiten und des 24. Zeitabschnittes des STD-Experiments. Die Spektren zeigen keine Veränderung, also keinen Reaktionsumsatz. Aufnahmebedingungen: Tabelle 89, S. 179.

In einem zweiten Versuch wurde eine andere Pufferzusammensetzung für die Dialyse ausgewählt (25 mM Tris-HCl- d_{11} , 100 mM NaCl, 20 mM NaN_3 , 20 μM ZnCl_2 , 1 mM DTT- d_9 , pH 7.5). Die Ausbeute an FTase nach dem Umpuffern betrug wieder etwa 80%. Die Bedingungen für die Proteinsättigung wurden noch einmal überprüft, lieferten aber keine anderen Werte. Auf Artefaktmessungen mit dem FDP und dem Peptid in dem veränderten Puffer wurde verzichtet. Während der Durchführung der STD-Experimente fand eine Dimerisierung des Peptids statt. Nach Zugabe von FDP zu der Probe wurde erneut kein Umsatz festgestellt. Aufgrund dieser Probleme wurde das Farnesyltransferase-Projekt abgebrochen.

4.7 Molecular Modeling

Um die experimentellen Ergebnisse aus den STD-Experimenten mit einem theoretischen Modell zu vergleichen, wurde ein Homologiemodell der (+)-Germacren D Synthase erstellt und die Bindung des Farnesyldiphosphat simuliert. Da der STD-Effekt auf dem Effekt der dipolaren Kopplung beruht, die mit dem Abstand der Protonen über die $1/r^6$ -Beziehung korreliert, kann durch Bestimmung aller intermolekularen Protonenabstände eine Abschätzung über das theoretische Bindungsepitop erfolgen.

4.7.1 Erstellung eines Homologiemodells der (+)-Germacren D Synthase

Die Erstellung eines Homologiemodells beginnt zunächst mit der Identifizierung einer oder mehrerer *template*-Strukturen. Hierfür wurde das *Template Identification Tool* des Webinterfaces von *Swiss Model* vom *Swiss Institute of Bioinformatics* verwendet, welches verschiedene *BLAST* Algorithmen (*Basic Logical Alignment Search Tool*) anbietet.⁹²⁻⁹⁴ Der gewählte *Gapped BLAST* Algorithmus führt das *alignment* gegenüber der *ExPDB*-Datenbank aus, die aus *RCSB PDB* extrahierte *Template*-Strukturen enthält. *Gapped BLAST* hat für die Sequenz der (+)-GDS 22 Kristallstrukturen identifiziert, die auf den Sequenzen von drei Terpensynthasen basieren. Den höchsten *score* erhält die 5-*epi*-Aristolochen Synthase aus *Nicotiana tabacum*, mit einer Sequenzhomologie von 38% (PDBID: 5EAT, 5EAS, 5EAU, u.a.), sowie die Monoterpen Synthasen Limonen- und Bornyldiphosphat Synthase aus *Mentha spicata* und *Salvia officinalis* mit jeweils 28% Sequenzhomologie (PDBID Limonen Synthase: 2ONG und 2ONH; PDBID Bornyldiphosphat Synthase: 1N1B, 1N1Z, 1N20-1N24).^{25;109;110} Die einzelnen Strukturen unterscheiden sich zunächst in der Art der co-kristallisierten Liganden bzw. durch Mutationen in den Proteinsequenzen. Weiterhin gibt es

Unterschiede in der Qualität der Kristallstrukturen, die anhand der Auflösung und der B-Faktoren (die mittlere Abweichung von der durchschnittlichen Lage eines Atoms) abgeschätzt werden können. Als mögliche *template*-Strukturen wurden die folgenden PDB-Datensätze ausgewählt: 5EAT, 5EAS, 5EAU, 2ONG und 1N1B. Da die *alignments* über das *Template Identification Tool* nur gegen die jeweilig identifizierte *template*-Sequenz durchgeführt werden, wurde anschließend ein *multiple sequence alignment* der Sequenz der (+)-GDS gegen die ausgewählten Sequenzen mit dem Tool *CLUSTAL W* vom *European Bioinformatics Institute* (Cambridge) durchgeführt (Anhang S. 201).¹¹¹

Für die Erstellung des Homologiemodells selbst wurde das Programm *DeepView* vom *Swiss Institute of Bioinformatics* verwendet. Nach dem Laden der ausgewählten *template*-Strukturen kann ein *structural alignment* erfolgen, für das anschließend ein *fit* der *template*-Strukturen erfolgt, so dass die Raumkoordinaten der Modelle aufeinander abgestimmt werden. Anschließend lädt man die *target*-Sequenz ein und führt einen *fit* auf die *template*-Strukturen durch. Im *alignment*-Fenster kann das *alignment* von Hand interaktiv manipuliert und verbessert werden. Abschließend kann dieses *structural alignment* als Projekt gespeichert und über das *Swiss Model* Webinterface dem *modeling server* übermittelt werden. Nach einigen Minuten kann man sich das fertige Homologiemodell über einen *workspace* herunterladen. Zusätzlich kann man eine pdf-Datei erstellen die verschiedene Daten über das durchgeführte *modeling* enthält. Neben dem *alignment* findet man einen *modeling log* sowie graphische Plots verschiedener Evaluierungsfunktionen (ANOLEA, GROMOS, Verify 3D), mit deren Hilfe die Güte der erhaltenen Modelle abgeschätzt werden kann. Das *modeling log* enthält zudem die *final total energie* des Modells.⁹³

Es konnten erfolgreich verschiedene Homologiemodelle generiert werden, die mit Hilfe Evaluierungsfunktionen und des *modeling log* verglichen wurden. Das beste Ergebnis wurde erzielt, wenn als Templatestruktur nur der PDB-Datensatz 5EAT der 5-*epi*-Aristolochin Synthase ausgewählt wurde. Die *final total energy* betrug -23 332 kJ/mol (GROMOS). Das Datenblatt des Homologiemodells ist im Anhang ab S. 203 gezeigt (PGDS97). Dort sind das *alignment*, das *modeling log* und die *plots* der Evaluierungsfunktionen gezeigt.

Ein Problem beim Aufbau der Homologiemodelle stellen die Protein-*loops* dar, insbesondere wenn sich die Anzahl der Aminosäurereste in der *template*- und *target*-Struktur unterscheiden. Bei *Swiss-Model* erfolgt die Bindungsverknüpfung der *loops* bei einer Neuberechnung über das Stickstoffatom der Amidbindungen. Bei ungünstiger Geometrie der

in dem *loop* enthaltenen Aminosäuren kann das zu unrealistischen ω -Winkeln CO-NH-C(α) führen, die bei einer Minimierung nicht korrigiert werden. Ein weiteres Problem stellen *cis*-Prolinreste dar, die in der *target*-Struktur durch eine andere Aminosäure ersetzt sind. Meist bleibt die *cis*-Konfiguration der Peptidbindung erhalten. Deshalb müssen die Homologiemodelle, die erhalten werden, im Bereich solcher Problemstellen sehr genau überprüft werden. Für das *alignment* der (+)-GDS und der 5-*epi*-Aristolochin Synthase sind die entsprechenden Bereiche in Tabelle 19 zusammengefasst.

Tabelle 19: Peptid-*loop*-Sequenzen, für die eine Neuberechnung durchgeführt wurde. Markiert sind die Stellen, die bei der Erstellung des Homologiemodells der (+)-Germacren D Synthase basierend auf den Strukturdaten der 5-*epi*-Aristolochinsynthase Probleme bereiteten.

| Protein | <i>Loop</i> -Sequenz |
|----------|--|
| pGDsynth | ⁵⁸ LDDPAKH ⁶⁴ |
| 5EAT | G---RKL |
| pGDsynth | ¹⁸³ LRCNNTLSR ¹⁹¹ |
| 5EAT | ---KSP ^L RE |
| pGDsynth | ²¹⁶ FY-EQQD ²²¹ |
| 5EAT | SIYDKEQ |
| pGDsynth | ³²⁵ WSTC-MDTF ³³² |
| 5EAT | WDINEIDRL |
| pGDsynth | ³⁷⁴ LTGGYM ³⁷⁹ |
| 5EAT | VR-NYN |
| pGDsynth | ⁴¹⁸ PGDIVTQDS ⁴²⁶ |
| 5EAT | KSA-TEQD |
| pGDsynth | ⁴⁹⁸ ETLTC ^K ⁵⁰³ |
| 5EAT | GLLRPT |
| pGDsynth | ⁵²³ IYK-NGD ⁵²⁸ |
| 5EAT | TYIH ^N LD |

Alle der aufgelisteten Stellen führten tatsächlich zu unrealistischen Bindungswinkeln CO-NH-C(α). Um diese Stellen korrigieren zu können, bieten die verschiedenen Software-Pakete sogenannte *looptools* an, mit denen eine Neuberechnung der *loops* möglich ist. Diese *looptools* greifen entweder auf eine Datenbank mit *loops*, basierend auf bekannten Strukturen aus PDB, zurück oder sie führen eine Neuberechnung einer *loop*-Struktur mit realistischeren

Bindungswinkeln durch. Die Korrekturen wurden mit der Software SYBYL durchgeführt. Im Gegensatz zu anderen Softwarepaketen erfolgt die Bindungsknüpfung bei der Neuberechnung der *loops* über die C(α)-Atome der jeweilig vor- und nachstehenden Aminosäuren. Weichen die NH-C(α)-CO-Bindungswinkel etwas von realistischen Werten ab, kann dies durch eine Minimierung in SYBYL besser korrigiert werden, als die unrealistischen ω -Bindungswinkel. Bei der Neuberechnung der *loops* wird zunächst nur das Peptidrückgrat erzeugt. So lässt sich abschätzen, ob der *loop* sterisch mit der übrigen Proteinstruktur vereinbar ist. Die Seitenketten werden im Anschluss angefügt. Dabei muss genau überprüft werden, ob es zu sterischen Hinderungen mit Seitenketten von benachbarten Aminosäuren kommt. Leichte sterische Hinderungen werden bei einer Minimierung korrigiert. Bei Überlappung von einzelnen Atomen kann es notwendig sein, Korrekturen von Hand durchzuführen.

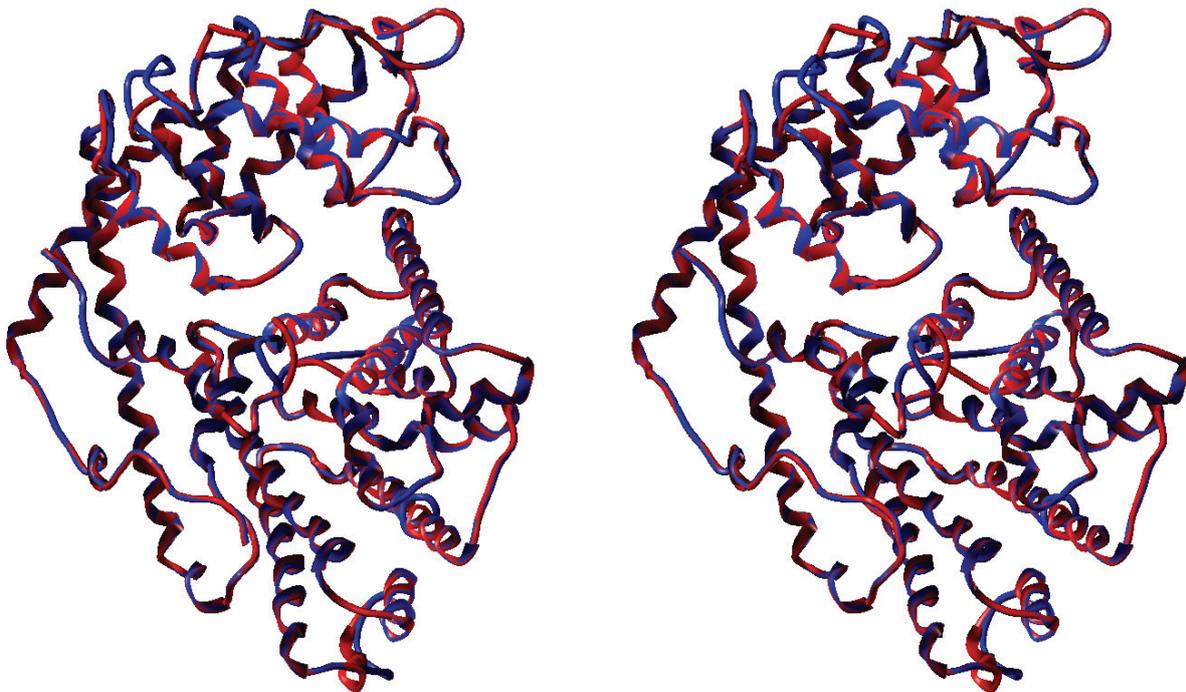


Abbildung 75: Vergleich der Struktur des Homologiemodells der (+)-Germacren D Synthase (blau) mit der Röntgenstruktur der 5-*epi*-Aristolochensynthase (rot) (Stereoansicht: *cross eyed*).

In Abbildung 75 sind die überlagerten Strukturen der (+)-GDS und der 5-*epi*-Aristolochensynthase dargestellt. Für nahezu alle Strukturbereiche findet man identische Sekundärstrukturen. Größere Abweichungen im Peptidrückgrat kommen nur im Bereich einiger *loops* vor. Die RMSD beider Strukturen beträgt 1.004 Å / 1.296 Å bezüglich des Proteinrückgrats / aller Atome.

Im Anschluss sollte eine Verbesserung des Homologiemodells, zunächst durch eine Minimierung und danach durch eine Moleküldynamiksimulation, erfolgen. Die Energie des Modells betrug zu Anfang 8.4×10^7 kcal/mol. Der hohe Wert für die Anfangsenergie weist auf einige sterische Hinderungen von Seitenketten hin, die vor allem aus der Modellierung der *loops* resultieren. Die Energie nach 2500 Minimierungsschritten betrug -1153 kcal/mol. Alle Versuche eine Moleküldynamiksimulation durchzuführen verliefen allerdings ohne verwertbares Ergebnis. Innerhalb der ersten 10000 ps finden starke Konformationsänderungen an der Proteinstruktur statt, die zu einer Art „Aufblähen“ des Modells führen. Dabei ändert sich die relative Anordnung der α -Helices zueinander. Als Folge verschiebt sich die Anordnung der Aminosäuren im aktiven Zentrum. Danach kontrahiert die Struktur zwar wieder etwas, weicht aber weiterhin deutlich von der Startstruktur ab. Im weiteren Verlauf der MD-Simulation gehen Teile der α -helicalen Sekundärstrukturbereiche verloren, wodurch es zu weiteren Strukturveränderungen im aktiven Zentrum kommt. Das Problem liegt wahrscheinlich in der weitgehend α -helicalen Struktur der (+)-GDS, die für das *modeling* nicht robust genug ist. Alle Versuche die Konformationsänderungen in der Startphase der MD-Simulation einzuschränken führten zu keinem Ergebnis. Aus diesem Grund wurde auf eine MD-Simulation verzichtet und mit der energieminierten Struktur weitergearbeitet.

Für die Berechnung der theoretischen STD-Effekte wurde ein Modell von Farnesyldiphosphat auf Grundlage der Ligandstruktur in dem PDB-Datensatz 5EAT der *5-epi-Aristolochin* Synthase erstellt. Für diesen Datensatz wurde das Enzym mit dem FDP-Analogen Farnesylhydroxyphosphonat (FHP) kokristallisiert. Das FDP sowie die drei Magnesiumionen und vier ausgewählte Wassermoleküle aus der Röntgenstruktur wurden in das Homologiemodell der (+)-GDS modelliert. Die Wassermoleküle wurden als mögliche Koordinationspartner der Magnesiumionen in Betracht gezogen.

Damit die Magnesiumionen bei der Energieminimierung durch das TRIPOS-Kraftfeld berücksichtigt werden konnten, mussten die Parametersätze um die Werte für typische Mg-O-Bindungsabstände erweitert werden. Die Werte wurden durch Analyse der Röntgenstruktur der *5-epi-Aristolochin* synthase und den dort vorhandenen Mg-O-Bindungsabständen abgeschätzt.²⁵

Die Minimierung konnte erfolgreich durchgeführt werden, wobei sich eine Energie von -1294 kcal/mol für den Komplex aus der (+)-GDS, dem FDP, den Magnesiumionen und den Wassermolekülen ergab. Die Energie der (+)-GDS alleine beträgt -1189 kcal/mol, woraus

eine Bindungsenergie von -106 kcal/mol folgt. Abbildung 76 zeigt die übereinandergelegten aktiven Zentren der (+)-GDS nach der Minimierung mit dem der 5-*epi*-Aristolochen Synthase. Diese besitzen bezüglich der angrenzenden Aminosäuren eine hohe Homologie, obwohl die Sequenzhomologie beider Enzyme bei nur 38% liegt. Die Kohlenwasserstoffketten von FDP und FHP liegen sehr ähnlich in dem hydrophoben Teil des aktiven Zentrums. Allerdings ragt die Diphosphateinheit deutlich tiefer in den polaren Teil hinein. Im Gegensatz zu dem FHP orientieren sich die Magnesiumionen deutlich näher zu der Diphosphatgruppe.

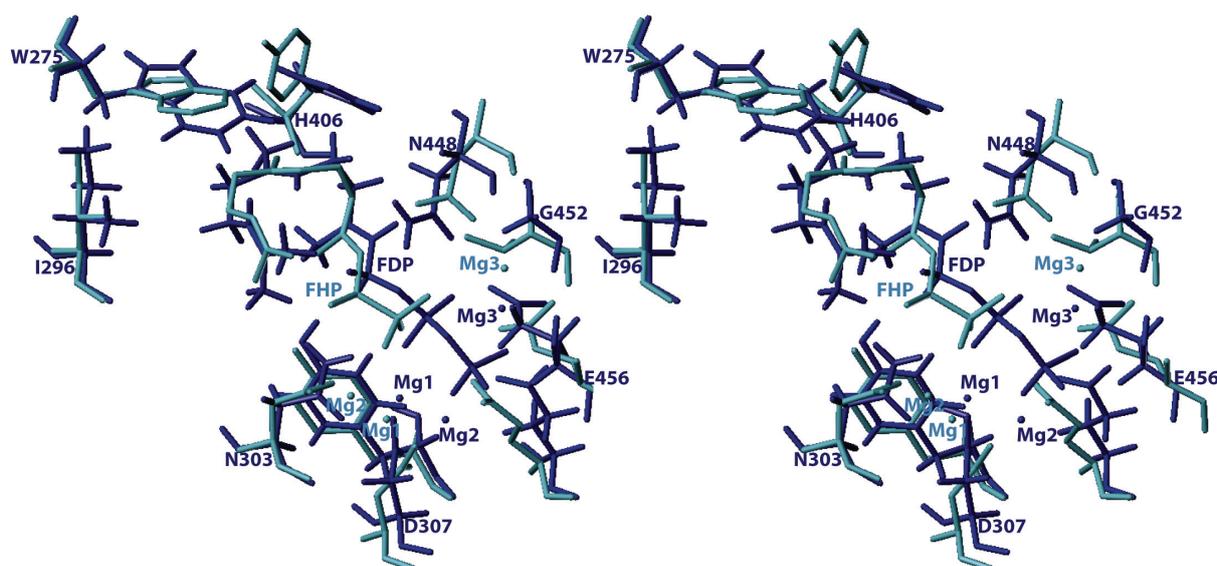


Abbildung 76: Überlagerung der aktiven Zentren der (+)-Germacren D Synthase (blau) und der 5-*epi*-Aristolochen Synthase (cyan) (Stereoansicht: *cross eyed*). Beide Enzyme weisen für die Aminosäuren, die das aktive Zentrum begrenzen, eine hohe Homologie auf.

In Abbildung 77 ist die Oberfläche (nach *Connolly*) des aktiven Zentrums der (+)-GDS sowie einige der angrenzenden Aminosäuren dargestellt. Die Oberfläche zeigt entsprechend der Hydrophobie im Protein einen Farbverlauf von braun nach blau. Dabei zeigt der obere Teil, in dem die Kohlenwasserstoffkette des FDP gebunden wird, eine deutliche Braunfärbung (hohe Hydrophobie), die bläuliche Farbe im unteren Bereich deutet auf eine Anhäufung polarer Gruppen hin. Der Farnesylrest nimmt in der Tasche eine gefaltete Konformation ein, bei der die C10-C11 Alkenbindung dem C1-Atom deutlich angenähert ist. Diese Konformation begünstigt nach der Abspaltung der Diphosphatgruppe die Cyclisierung durch die räumliche Nähe der beiden Reaktionszentren. Die beiden natürlichen aber seltenen Mutationen bei den Aminosäuren D303N und S452G, die in den Bindungsstellen für das Magnesium auftreten,

sind in der Farbe Magenta hervorgehoben. Die Carbonylgruppe der Asparaginseitenkette von N303 wurde vor der Minimierung so ausgerichtet, dass sie senkrecht zu der Carboxylatgruppe von D307 steht. Hierbei hätte theoretisch eine Wechselwirkung zu den beiden Magnesiumionen, die üblicherweise durch das DDXXD/E-Bindungsmotiv koordiniert werden, möglich sein sollen. Allerdings war die Wechselwirkung zu der Carbonylgruppe zu schwach, so dass sich eines der Magnesiumionen während der Minimierung von der Koordinationsstelle im Protein wegbewegt und sich stattdessen näher an die Diphosphatgruppe orientiert.

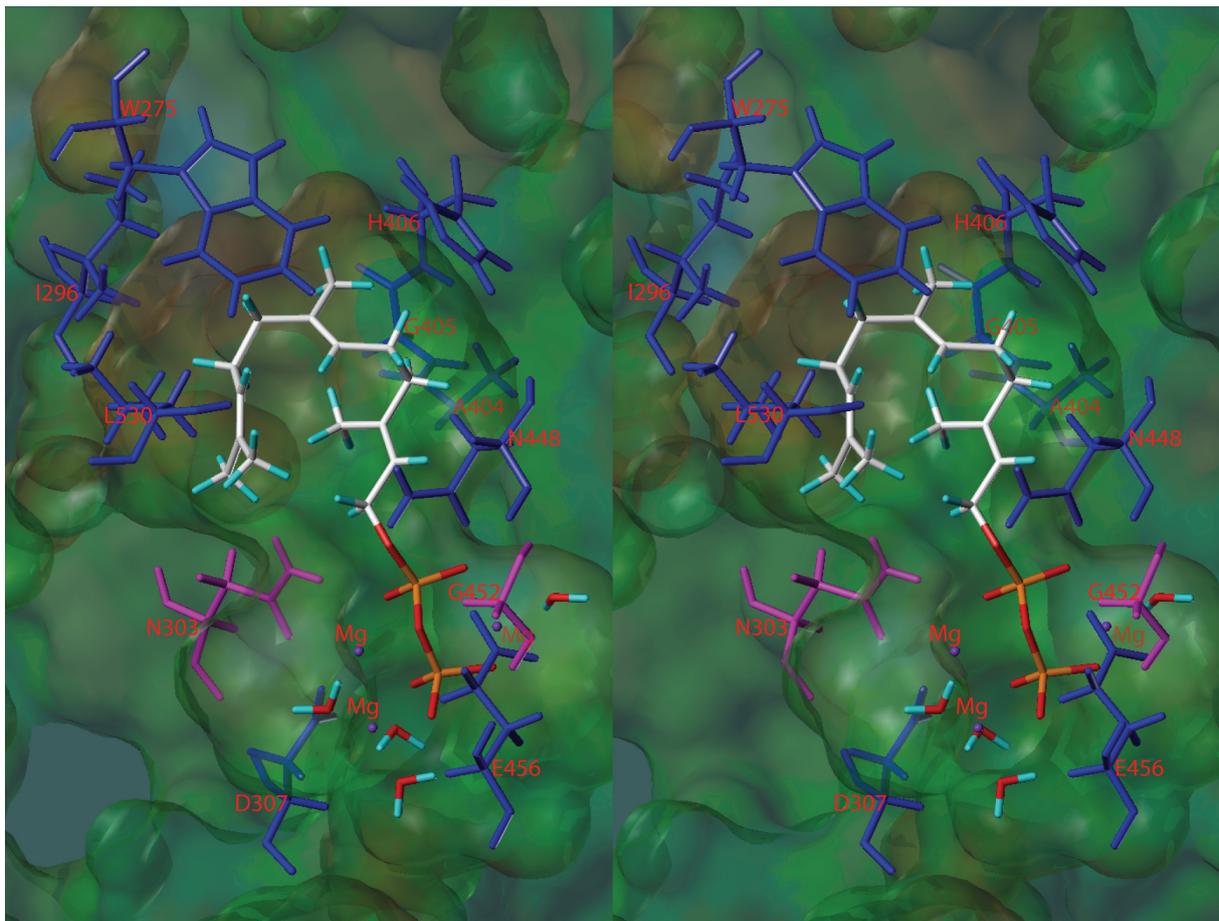


Abbildung 77: Bindung von Farnesyldiphosphat im aktiven Zentrum der (+)-Germacren D Synthase (Stereoansicht: *cross eyed*). Die Oberfläche (*Connolly*) des Enzyms zeigt einen Farbverlauf entsprechend der Hydrophobie von braun (hydrophob) nach blau (hydrophil). Einige ausgewählte Aminosäuren, die das aktive Zentrum umschließen sind in blau dargestellt. Die beiden natürlichen Mutationen D303N und S452G, die in den Bindungsstellen für das Magnesium der (+)-Germacren D Synthase auftreten, sind in der Farbe Magenta hervorgehoben. Während der Teil des aktiven Zentrums, der den Farnesylrest bindet, mit hydrophoben Aminosäuren angereichert ist, umgeben viele geladene Aminosäuren den phosphatbindenden Teil.

Die Koordinierung der Magnesiumionen durch die (+)-GDS, das FDP und die Wassermoleküle ist in Abbildung 78 gezeigt. Das Motiv $^{303}\text{NDTYD}^{307}$ koordiniert eines der drei Magnesiumionen. Weitere Koordinationsstellen sind durch jeweils ein Sauerstoffatom der beiden Phosphatgruppen und durch ein Wassermolekül besetzt. Das zweite Magnesiumion, welches typischerweise ebenfalls durch das DDXXD/E-Motiv koordiniert wird, zeigt nur noch Kontakt zu D307 und wird weiter durch zwei Sauerstoffatome der terminalen Phosphatgruppe sowie durch zwei Wassermoleküle koordiniert. Das dritte Magnesiumion wird durch die Seitenketten der Aminosäuren N448 und E456 sowie durch jeweils ein Sauerstoffatom der beiden Phosphatgruppen und ein Wassermolekül gebunden. Durch die Mutation S452G kann keine Wechselwirkung zu dem Magnesium stattfinden, so dass auch das dritte Magnesiumion sich deutlich der Diphosphatgruppe annähert. Für jedes Magnesiumion sind 5-6 Koordinationsstellen abgesättigt. Anhand dieses Modells sollte es nun möglich sein, die dipolaren Kopplungen für die einzelnen FDP-Protonen abzuschätzen und daraus ein theoretisches Bindungsepitop zu erstellen.

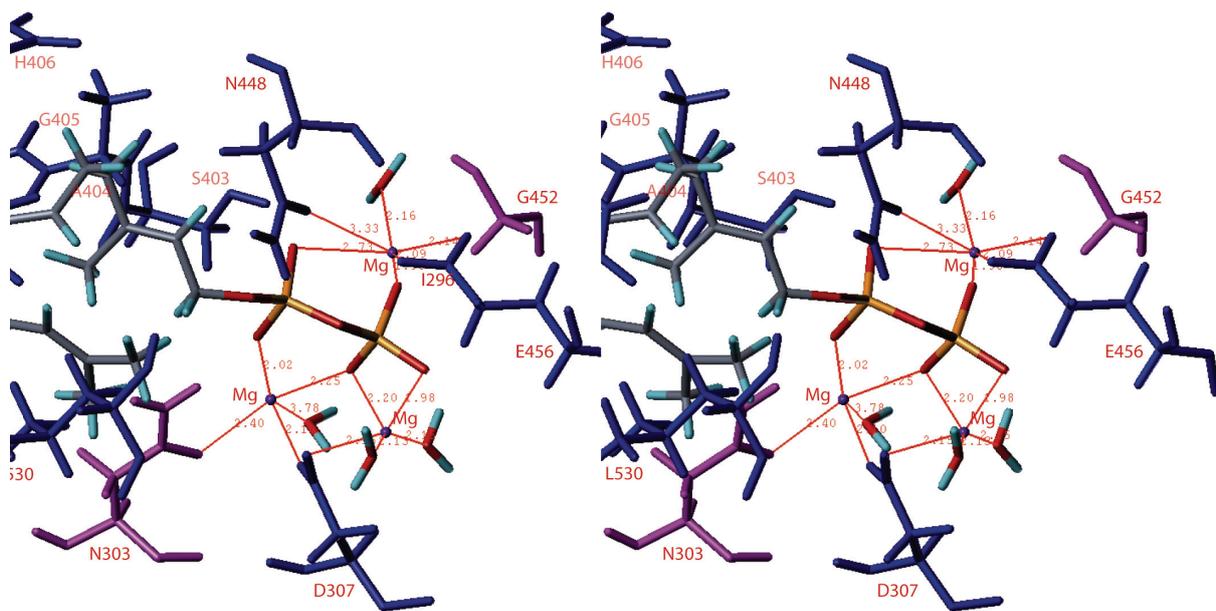


Abbildung 78: Koordinierung der FDP-Diphosphatgruppe durch die drei Magnesiumionen im aktiven Zentrum der (+)-Germacren D Synthase (Stereoansicht: *cross eyed*). Einige ausgewählte Aminosäuren, die das aktive Zentrum umschließen sind in blau dargestellt. Die beiden natürlichen Mutationen D303N und S452G, die in den Bindungsstellen für das Magnesium der (+)-Germacren D Synthase auftreten, sind in der Farbe Magenta hervorgehoben.

Um das theoretische Modell mit den Messdaten vergleichen zu können muss das experimentelle Bindungsepitop noch gegen die longitudinale Relaxationszeit korrigiert werden. Entsprechend der Gleichung 4 (S. 24) lässt sich der STD-Effekt in Abhängigkeit der Relaxationsrate darstellen (Abbildung 79). Aufgetragen sind die experimentellen STD-Antworten der FDP-Protonen gegen die Relaxationsrate als Datenpunkte. Hierfür wurden die absoluten STD% aus Abbildung 69 und die Relaxationsraten entsprechend der Tabelle 12 verwendet. Die Kurve entspricht einer Anpassung der Gleichung 4 an die Datenpunkte für die Messparameter der STD-Messung aus der das Epitop stammt. Die Sättigungsrate (Sat) wird dabei für alle Protonen als konstant angenommen, ist also unabhängig von den Kreuzrelaxationspfaden und somit von den Protonenabständen. Als Parameter stehen die Enzymkonzentration und die Ligandausgangskonzentration fest. Die Relaxationsrate R_2 ($1/T_2$) des Proteins lässt sich über eine Näherung für die Korrelationszeit τ_c abschätzen, für ein Molekulargewicht von 65 kDa wurde ein Wert von 50 s^{-1} angenommen.⁷¹ Die Dissoziationskonstante ergibt sich als Quotient der Dissoziationsrate k_{-1} und der Assoziationsrate k_1 . Für k_1 wurde ein Wert von $10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ abgeschätzt. Variationen der Parameter k_1 und R_2 zeigten nur einen geringen Einfluss auf den Kurvenverlauf. Dagegen konnte die Kurve durch Variation von k_{-1} leicht an die Datenpunkte angepasst werden. Für den Verlauf von Abbildung 79 ergab sich für k_{-1} ein Wert von 2.5 s^{-1} . Dieser liegt in derselben Größenordnung wie die 1.2 s^{-1} , die bereits die SPR-Messungen ergeben haben.

Anhand der Kurve aus Abbildung 79 kann das experimentell bestimmte Bindungsepitop für das FDP gegen die Relaxationsrate korrigiert werden. Für die Relaxationsrate von H-1 ergibt sich ein theoretischer STD-Effekt von 3.2% (~ 0.032), für die Relaxationsraten von H-10 und H-14 von 6.3% (~ 0.063). Die langsame T_1 -Relaxation von H-10 und H-14 bewirkt also einen doppelt so großen STD-Effekt wie die um den Faktor vier höhere von H-1. Wie die Grafik in Abbildung 79 nahelegt, ist das Bindungsepitop des FDP im Wesentlichen durch die Relaxationszeiten moduliert, d.h. alle Protonen erfahren im Protein eine ähnliche Sättigung. Tabelle 20 bestätigt diese Vermutung. Nach der Korrektur der experimentellen STD (STD_{exp}) gegen die berechneten $STD(R_1)$ liegt das relative Bindungsepitop ($STD_{rel(exp)}$) für fast alle FDP-Protonen bei über 80%, nur H-5, H-10 und H-15 erfahren einen geringeren Sättigungstransfer.

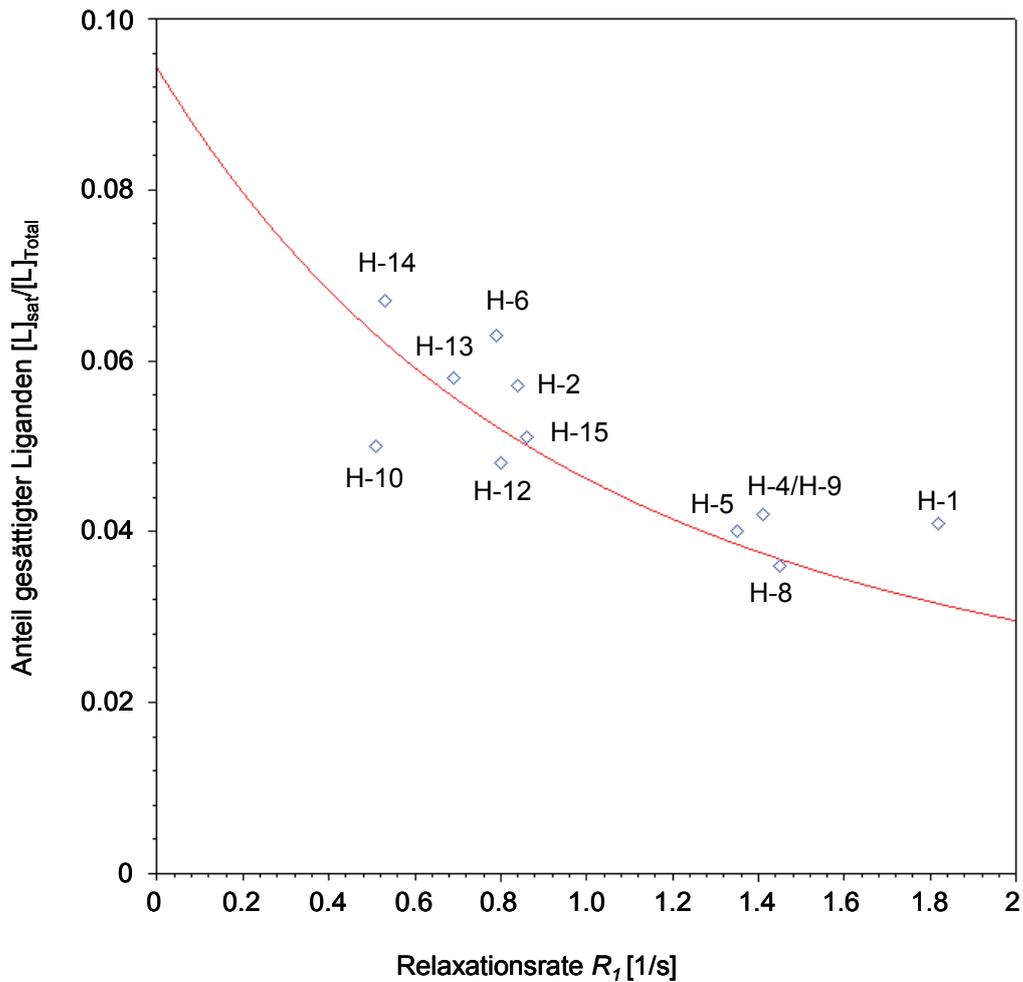


Abbildung 79: Anpassung der Gleichung 4 zur Bestimmung von STD (Anteil gesättigter Liganden) als Funktion der longitudinalen Relaxationsrate $STD(R_1)$. Aufgetragen sind als Datenpunkte die Messergebnisse für das Bindungsepitop von FDP (absolute STD aus Abbildung 69) gegen die Relaxationsrate entsprechend der Tabelle 12. Die folgenden Parameter wurden verwendet: $k_{-1} = 2.5 \text{ s}^{-1}$, $k_1 = 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, $[P]_{total} = 2 \times 10^{-6} \text{ M}$, $R_2 = 50 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, $[L]_{total} = 165 \times 10^{-6} \text{ M}$. Die Kurve reagierte am sensitivsten auf k_{-1} . Die Anpassung wurde auf k_{-1} „von Hand“ durchgeführt.

Tabelle 20: Korrektur des experimentell bestimmten Bindungsepitops von FDP gegen die berechneten $STD(R_1)$. STD_{exp} : experimentelle STD%; STD_{R1} : korrigierte STD%; STD_{rel} : STD_{R1} normiert auf 1.

| | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| $STD(R_1)$ | 3.2 | 5.1 | 3.6 | 3.8 | 5.3 | 3.6 | 3.6 | 6.3 | 5.3 | 5.6 | 6.3 | 5.1 |
| STD_{exp} | 4.1 | 5.7 | 4.2 | 3.6 | 6.3 | 4.0 | 4.2 | 5.0 | 4.8 | 5.8 | 6.7 | 5.1 |
| STD_{R1} | 8.1 | 7.0 | 7.4 | 6.0 | 7.5 | 7.0 | 7.4 | 5.0 | 5.7 | 6.5 | 6.7 | 6.3 |
| $STD_{rel(exp)}$ | 1.00 | 0.87 | 0.91 | 0.74 | 0.93 | 0.87 | 0.91 | 0.62 | 0.71 | 0.81 | 0.83 | 0.78 |

Mit Hilfe des Modells für den Komplex zwischen der (+)-GDS und dem FDP konnten nun alle Protonen, die zur dipolaren Kopplung beitragen, bestimmt werden (Auflistung der Daten S. 209). Hierfür wurde für jedes Proton des Farnesyldiphosphats der Abstände zu allen Protonen in einem Radius von 5 Å bestimmt. Da das FDP bei Eintritt in die Bindungstasche Sättigung erfährt, wurden die intramolekularen Bindungsabstände mit einbezogen. Aufgrund der freien Rotation wurde für die Methylgruppen jeweils nur der kürzeste Bindungsabstand in die Rechnung mit einbezogen. Jede H-H-Wechselwirkung trägt mit $1/r^6$ zur dipolaren Kopplung bei. Durch Addition aller $1/r^6$ -Komponenten wird so schließlich ein Wert erhalten, welcher der Sättigungsrate proportional ist. Tabelle 21 fasst die Ergebnisse der Berechnung zusammen. Für das relative Bindungsepitop $STD_{rel(th)}$, das berechnet wurde, wurde eine Farbkodierung eingeführt, um die Abweichung für jedes Proton von den experimentell bestimmten Werten $STD_{rel(exp)}$ zu kennzeichnen (Weiß: <10%; Gelb: 10-15%; Rot: >15%). Für die Signale der Methylenprotonen H-4, H-5, H8 und H-9 sowie für H-10 und die Methylgruppen H-12, H14 und H-15 liegt die Abweichung bei unter 15%. Nur für die Protonen von H-1, H-2, H-6 und H-13 weichen die berechneten und experimentell bestimmten Werte deutlich voneinander ab. Dabei sollte berücksichtigt werden, dass im Modell die Struktur der (+)-GDS nicht optimiert werden konnte und der Struktur der 5-*epi*-Aristolochen Synthase noch sehr angepasst ist. Insofern stimmen Modell und Praxis recht gut überein.

Tabelle 21: Summe aller $1/r^6$ -Beziehungen ($\times 10^{-2}$) für die jeweiligen FDP-Protonen in der Bindungstasche der (+)-GDS. STD_{rel} entspricht dem auf 1 normierten Bindungsepitop, das aus der Abstandberechnung folgt. Die Farbmarkierung gibt die Abweichung zu dem experimentellen und gegen R_1 korrigierten Werten von STD_{rel} aus Tabelle 20 wieder. Weiß: <10%; Gelb: 10-15%; Rot: >15%.

| | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| $\sum(1/r^6)$ | 3.5 | 1.9 | 5.1 | 4.4 | 2.6 | 3.8 | 4.0 | 3.3 | 3.5 | 3.0 | 4.2 | 4.1 |
| $STD_{rel(th)}$ | 0.69 | 0.37 | 1.00 | 0.86 | 0.51 | 0.76 | 0.78 | 0.64 | 0.70 | 0.60 | 0.84 | 0.81 |

Abschließend lassen sich zwei wichtige Schlussfolgerungen aus den theoretischen Betrachtungen ziehen. Das aktive Zentrum der (+)-Germacren D Synthase bildet eine enge Ummantelung für den hydrophoben Rest des Substrats. Die Form des aktiven Zentrums bestimmt die Bindungskonformation und besitzt einen wichtigen Einfluss auf die Produktspezifität. Das verdeutlicht Abbildung 77, welche die Oberfläche des aktiven

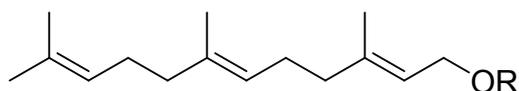
Zentrums zeigt. Die Notwendigkeit Wasser von der Reaktion auszuschließen wird durch die enge Ummantelung ebenfalls gewährleistet. Durch die enge räumliche Nähe zwischen Enzym und Substrat kommt eine Vielzahl von intermolekularen Proton-Proton-Kontakten zustande, was sich durch einen Sättigungstransfer auf das gesamte Substrat auswirkt. Dieser Effekt wird durch die gefaltete Konformation, die das FDP in der Bindungstasche annimmt, zusätzlich verstärkt, da für jedes FDP-Proton zusätzlich mehrere FDP-Protonen als dipolare Kopplungspartner zur Verfügung stehen. Aus diesem Grund findet man für das FDP ein Bindungsepitop, dass vornehmlich durch die T_1 -Relaxationszeiten bestimmt ist. Das zweite wichtige Resultat ist der *fit* der Gleichung 4 auf das experimentell bestimmte Bindungsepitop. Dabei zeigt sich, dass die Bindungskinetik die Größe der STD-Antworten in den Spektren, nach Korrektur gegen die Artefaktmessungen, widerspiegelt. Zusammen mit den übrigen Resultaten aus den Voruntersuchungen kann dieses Ergebnis als zusätzliche Bestätigung für einen Erfolg der durchgeführten Experimente gewertet werden. Im Umkehrschluss konnte die Dissoziationskonstante k_{-1} für das FDP und die (+)-GDS in den STD-Experimenten bestimmt werden. Diese bestätigt wiederum das günstige Verhältnis von k_{-1}/k_2 der Enzymreaktion, welches die Durchführung der enzymkinetischen Untersuchungen mittels STD ermöglichte.

5 AUSBLICK

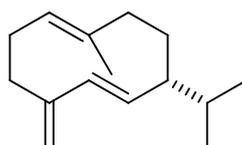
Im Rahmen dieser Arbeit gelang die Untersuchung eines komplexen Protein-Ligand-Systems mittels STD-NMR-Spektroskopie. Die Komplexität bestand dabei hauptsächlich in dem Löslichkeitsverhalten der Liganden in Wasser. Insbesondere konnten Unterschiede zwischen den Farnesylphosphaten als Amphiphile und dem (+)-Germacren D als reiner Kohlenwasserstoff aufgezeigt werden. Da erstere homogene Lösungen bilden, zeigen diese aufgrund der Aggregation zu Micellverbänden konzentrationsabhängig ansteigende Signalintensitäten in ihren Artefaktspektren. Das (+)-Germacren D dagegen bildet emulsionsartige Lösungen, die keine Artefaktsignale zeigen. Offensichtlich stellt die Emulsion ein Zweiphasen-System dar. Die hydrophobe Phase wird NMR-spektroskopisch nicht detektiert und es findet nur ein langsamer chemischer Austausch zwischen beiden Phasen statt. Die Eigenschaften dieses Systems sollten weiter untersucht werden. Hierbei stellt sich z.B. die Frage, wie hoch der Anteil des Kohlenwasserstoffs in der wässrigen Phase ist. Zudem hat es sich gezeigt, dass das enzymatisch abgegebene (+)-Germacren D deutlich besser in Lösung geht, als dies artifiziell erreicht werden konnte. Eine Optimierung bei der Herstellung der Lösungen wäre wünschenswert. Für das (+)-Germacren D wären weitere Bindungsstudien und Untersuchungen über das Produktinhibitionspotential wichtig.

Für die Untersuchung von Enzymreaktionen konnte ein neues Experiment entwickelt werden, mit dem enzymkinetische Daten über die Analyse der Progresskurven erhalten werden können und zusätzlich Informationen über das Bindungsepitop zugänglich sind. Leider hat sich herausgestellt, dass das untersuchte Enzym-Substrat-System aufgrund der oben erwähnten Komplexität Probleme bei der Analyse der Daten macht. Offene Fragestellungen sind dabei, welche Bedingungen von der Enzymseite tolerierbar sind, wie gut sich das Experiment durch Veränderungen der Reaktionsbedingungen optimieren lässt und wie robust das Experiment bezüglich der Variation der Parameter ist, so dass handhabbare Datensätze erhalten werden können. Auch die Robustheit der mathematischen Modelle muss überprüft werden, um eine hohe Anwendungsbreite des Experiments zu ermöglichen.

6 ZUSAMMENFASSUNG



- 1) R = PO_3^{2-} Farnesylmonophosphat, FMP
- 2) R = $\text{P}_2\text{O}_6^{3-}$ Farnesyldiphosphat, FDP



(+)-Germacren D

Abbildung 80: Die in dieser Arbeit untersuchten Liganden.

Wie in der Einleitung dieser Arbeit dargelegt wurde, gibt es eine Vielzahl von Beispielen, bei denen hydrophobe Wechselwirkungen in Bezug auf molekulare Erkennungsprozesse in biologischen Systemen eine wichtige Rolle spielen. Das STD-NMR-Verfahren hat sich zu einer wichtigen Methode entwickelt, mit der Bindungsvorgänge in Protein-Ligand-Systemen untersucht und charakterisiert werden können. Eines der Probleme, welches bei dem Umgang mit hydrophoben (oder amphiphilen) Verbindungen in wässriger Lösung auftritt, besteht in der spontanen Selbstassoziation (Aggregation) der hydrophoben oder amphiphilen Monomere zu großen Molekülverbänden. Das Messprinzip des STD-Experiments beruht auf der selektiven Sättigung eines Proteins, die aufgrund der Unterschiede in den T_2 -Relaxationszeiten zu kleinen organischen Molekülen möglich ist. Die Aggregation kleiner Moleküle stellt wiederum eine weitere Quelle für Strukturen mit großem Molekulargewicht dar. Die (+)-Germacren D Synthase wurde als ein Modellsystem gewählt, um die Bindung hydrophober Liganden anhand von STD-Experimenten zu untersuchen.

Um geeignete Bedingungen für die NMR-spektroskopischen Experimente zu finden, wurde das Enzym zunächst bezüglich seiner Stabilität und Aktivität in Tris-Puffern unterschiedlicher Zusammensetzungen und bei verschiedenen Temperaturen untersucht. Die Enzymaktivitäten wurden mit Hilfe eines radiochemischen Assays ermittelt. Anhand dieser Voruntersuchungen konnte ein geeignetes Puffersystem für die NMR-spektroskopischen Experimente gefunden werden.

Im Anschluss erfolgte eine Überprüfung des Löslichkeitsverhaltens der Liganden im ausgewählten Messpuffer. Das STD-Verfahren hat sich dabei als äußerst sensitiver Indikator für das Aggregationsverhalten von Farnesylmonophosphat (FMP) und Farnesyldiphosphat (FDP) erwiesen. Die Ergebnisse konnten zudem mit Hilfe einer etablierten NMR-Methode bestätigt werden, welche die Änderungen der chemischen Verschiebungen der Protonensignale von FMP und FDP gegen die Probenkonzentration verfolgt. Die Bestimmung der kritischen Micellkonzentrationen beider Verbindungen, die in *d*TBS/MgCl₂-Lösungen im Bereich von 60 μM liegen, war so möglich. Des Weiteren konnte die Konzentrationsabhängigkeit der Bildung von Artefaktsignalen in den STD-Spektren der reinen Ligandlösungen quantitativ erfasst werden. Anhand der Ergebnisse konnten die Einflüsse der Aggregation auf Bindungsstudien in Gegenwart des Enzyms abgeschätzt werden. Interessant war die Beobachtung, dass Referenzmessungen des Germacren D überhaupt keine Artefaktsignale zeigten. Dies wurde auf die Bildung eines Zweiphasensystems (Emulsion) zurückgeführt, bei dem nur ein langsamer chemischer Austausch zwischen den Phasen stattfindet.

Um eine spezifische Interaktion der Farnesylphosphate mit dem Enzym zu analysieren, wurde für beide Substanzen mittels SPR (*surface plasmon resonance*) die Bindung an das Enzym charakterisiert. In TBS (10 mM MgCl₂) ergaben sich Bindungskonstanten von 75 μM für das FDP und 93 μM für das FMP. Die spezifische Bindung konnte für das FMP mit der (+)-Germacren D Synthase durch eine STD-Titration bestätigt werden. Die Experimente wurden bei zwei unterschiedlichen MgCl₂-Konzentrationen durchgeführt und lieferten Bindungskonstanten von $K_D = 188 \mu\text{M}$ (10 mM MgCl₂) und $K_D = 567 \mu\text{M}$ (1 mM MgCl₂). Die Voruntersuchungen bezüglich des Löslichkeitsverhaltens von FMP erwiesen sich für die Auswertung der Daten als essentiell.

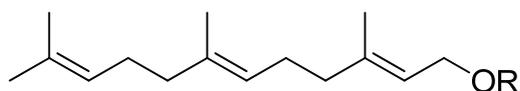
Da es sich bei der (+)-Germacren D Synthase um ein Ein-Substrat-Enzym handelt, können Bindungsstudien mit FDP nur unter Reaktionsumsatz stattfinden. Mit einem k_{cat} von 0.02 s^{-1} ist die (+)-Germacren D Synthase jedoch ein verhältnismäßig langsames Enzym. Der Umsatz liegt bei 1.2 Substratmolekülen pro Minute. Aufgrund von kurzen Messzeiten und großen Ligandüberschüssen bei den SPR-Experimenten spielte der Reaktionsumsatz nur eine untergeordnete Rolle. Bindungsstudien mittels STD-NMR-Spektroskopie erfordern dagegen wesentlich längere Messzeiten, bei denen der Umsatz nicht mehr vernachlässigbar ist. Aus diesen Überlegungen war die Idee entstanden, eine neue Variante des STD-Experiments

einzuführen, mit der sich Enzymreaktionen charakterisieren lassen. Die Variante besteht in der sequentiellen Akquisition von vielen STD-Spektren in nur einem Experiment. Wenn das Verhältnis k_{-1}/k_{cat} groß ist, kann der STD-Effekt beobachtet und das Bindungsepitop für das Substrat charakterisiert werden. Die *off-resonance* Spektren jedes STD-Experiments lassen sich für die Reaktionsverfolgung verwenden, so dass der Substrat-Zeit-Verlauf (Progresskurve) aufgezeichnet werden kann. Mit Hilfe Lambert W Funktion können durch Analyse der Progresskurven kinetische Daten erhalten werden. Sind die Signal-zu-Rauschverhältnisse individueller Spektren nicht ausreichend, können aufeinanderfolgende FIDs aufaddiert werden, um die Qualität der STD-Spektren nachträglich zu verbessern. Am Beispiel der (+)-Germacren D Synthase konnte diese neue Variante eines STD-Experiments demonstriert werden. Für unterschiedliche $MgCl_2$ -Konzentrationen im Messpuffer zeigte sich ein deutlicher Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit der (+)-Germacren D Synthase. Bei einer Konzentration von 1 mM $MgCl_2$ wurde für das FDP ein K'_M von 1.42 mM ermittelt. Dieser Wert ist mit der Dissoziationskonstante $K_D = 567 \mu M$ für das FMP konsistent, unter der Annahme einer Produktinhibition während der Enzymreaktion von FDP.

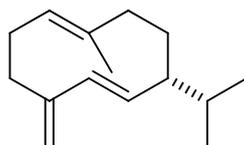
Sowohl für das FMP, als auch für das FDP, konnten die Bindungsepitope bestimmt werden. Der Vergleich zeigt übereinstimmende Epitope, wobei das Magnesium keinen Einfluss auf den Bindungsmodus für die hydrophoben Anteile der Farnesylphosphate hat. Um die Bindungsepitope in einem Modell diskutieren zu können, wurde ein Homologiemodell der (+)-Germacren D Synthase erstellt und mit Hilfe der $1/r^6$ -Beziehung ein theoretisches Epitop berechnet.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass sich die STD-NMR-Methode für Untersuchungen an Ligand-Systemen, bei denen sowohl die Wechselwirkung zu einem Protein als auch das Löslichkeitsverhalten in wässriger Lösung durch die hydrophoben Effekte dominiert werden, sehr gut eignet. Dabei liegt der große Vorteil der Methode in den Referenzmessungen, mit denen das Aggregationsverhalten charakterisiert werden kann. Das eigentliche STD-Experiment kann schließlich um die Ergebnisse der Referenzmessung korrigiert werden.

7 SUMMARY



- 1) R = PO_3^{2-} farnesyl monophosphate, FMP
- 2) R = $\text{P}_2\text{O}_6^{3-}$ farnesyl diphosphate, FDP



(+)-germacrene D

Abbildung 81: Ligands that were investigated in this work.

As laid out in the introduction hydrophobic interactions play a crucial role in many molecular recognition processes in biological systems. STD NMR has become an important tool for the characterization of protein-ligand binding processes. A problem in analyzing hydrophobic (or amphiphilic) ligands in aqueous solution is their spontaneous self association (aggregation) to larger molecular assemblies. STD experiment relies in the selective saturation of protein resonances. This is possible due to the differences in the T_2 relaxation time of proteins compared to small organic compounds. Self aggregation of small molecules on the other hand yields another structure of large molecular weight. (+)-Germacrene D synthase was chosen as a model system to investigate in the STD experiment the binding of hydrophobic ligands.

In order to find adequate conditions for NMR spectroscopic experiments, the enzyme stability and activity was examined in tris buffer solutions of different composition and at different temperatures. The enzyme activity was determined in a radioactive enzyme assay. From these preliminary investigations a suitable buffer system could be selected.

Subsequently, the solubility of the ligands was tested in the selected buffer. The STD method turned out to be a sensitive indicator concerning the aggregation behavior of the farnesyl monophosphate (FMP) and farnesyldiphosphate (FDP). These results were confirmed by established NMR techniques, plotting chemical shift changes of FMP and FDP proton signals against the sample concentration. The critical micelle concentration of both compounds in *d*TBS/MgCl₂ solution was assigned to approximately 60 μM . Additionally, the formation of

artifact signals arising from self aggregation was analyzed quantitatively by STD NMR as a function of the ligand concentration. Based on these results the influence of ligand aggregation on binding in presence of the enzyme could be estimated. An interesting observation was that reference measurements of germacrene D did not show any artifact signals. This was attributed to the formation of a two phase system (emulsion), which exhibited slow chemical exchange between the two phases.

In order to validate specific interactions of the farnesyl phosphates with the enzyme, binding to the enzyme was also characterized for both compounds by means of SPR (*surface plasmon resonance*). Binding constants of 75 μM for FDP and 93 μM for FMP were obtained. The binding affinity of FMP to germacrene D synthase was in agreement with data from a STD NMR titration. The experiments were accomplished at two different MgCl_2 concentrations and revealed dissociation constants of $K_D = 188 \mu\text{M}$ (10 mM MgCl_2) and $K_D = 567 \mu\text{M}$ (1 mM MgCl_2). The experimental STD NMR data could not have been interpreted without an exact knowledge of the FMP solubility.

Because (+)-germacrene D synthase is a one-substrate enzyme, binding studies with FDP can be accomplished exclusively during conversion of the substrate. However, (+)-germacrene D synthase is a relative slow enzyme with a k_{cat} of 0.02 s^{-1} equivalent to a conversion of about 1.2 substrate molecules per minute. In SPR experiments the conversion plays a minor role due to short sampling times and large substrate excesses. STD NMR spectroscopy needs much longer experiment times and substrate conversion cannot be neglected. This led to the development of a new version of the STD experiment that enables characterization of enzyme reactions. This version consists in a sequential acquisition of many STD spectra in one experiment. If k_{-1}/k_{cat} is high STD NMR effects can be observed and the binding epitope of the substrate can be determined. The off resonance spectra of each STD experiment can be used to track the reaction and the time course of loss of substrate can be plotted as a progress curve. Parameters of the enzyme kinetic can be calculated from the progress curve based on the Lambert W function. If the signal to noise ratio of the individual experiments is not sufficient, successive FIDs can be added up to improve STD spectra retrospectively. This new version of a STD experiment was demonstrated on (+)-germacrene D synthase. At a concentration of 1 mM MgCl_2 the FDP exhibited a K'_M of 1.42 mM. The value is consistent with the dissociation constant $K_D = 567 \mu\text{M}$ of FMP when product inhibition is assumed for the enzymatic reaction of FDP.

The binding epitopes of FMP and FDP were determined from STD NMR spectra. Comparison showed two very similar epitopes. The magnesium cations showed no effect on the binding mode of the hydrophobic part of the farnesylphosphates. In order to discuss the binding epitopes in a model enzyme / ligand complex, a homology model of the (+)-germacren D synthase was built. Based on the $1/r^6$ -relationship of STD effects a theoretical epitope was calculated and compared to the experimental data.

In summary, the results of this work demonstrated that STD NMR can even be used for largely hydrophobic or amphiphilic ligands whose interaction with the protein as well as their solubility is dominated by their hydrophobic nature. Reliable data for binding can only be obtained if the aggregation behavior of the ligand was analyzed by normal and STD NMR prior to the experiments in presence of the enzyme. These reference data are needed to correct the STD NMR data.

8 EXPERIMENTELLER TEIL

8.1 Chemikalien und Materialien

Standardchemikalien wurden im Allgemeinen von den Firmen Arcos, Merck, Fluka oder Sigma-Aldrich bezogen. Spezielle Chemikalien sind im Folgenden aufgelistet.

Tabelle 22: Verwendete Chemikalien.

| Hersteller/Lieferant | Chemikalien |
|--|--|
| <i>Amersham Biosciences</i> | [1- ³ H(n)]-Farnesyldiphosphat (555-740 GBq/mmol, 15-20 Ci/mmol, 7.4 MBq/mL. 200 µCi/mL) |
| <i>Acros Organics</i> | Acetonitril (Ultra Gradient HPLC-Grade), Triisopropylsilan (TIPS) |
| <i>Applied Biosystems Iris Biotech</i> | Diisopropylethylamin (DIPEA), Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz, Piperidin 25 % (v/v) in DMF |
| <i>Biacore</i> | <i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethylcarbodiimidhydrochlorid-Lösung (EDC), <i>N</i> -Hydroxysuccinimid-Lösung (NHS), 10 mM Acetat-Puffer pH 4.0, 1.0 M Ethanolamin-HCl pH 8.5 |
| <i>Biorad</i> | Standard Precision Plus Protein Dual, Standard Precision Plus Protein Unstained, Ammoniumperoxysulfat (APS) |
| <i>Biozym</i> | Agarose |
| <i>Cambridge IsotopeLab</i> | Tris-HCl- <i>d</i> ₁₁ , Dithiothreitol- <i>d</i> ₁₀ (DTT- <i>d</i> ₁₀) |
| <i>Deutero</i> | Deuteriumoxid, 99.9%, Dimethylsulfoxid- <i>d</i> ₆ (DMSO- <i>d</i> ₆) |
| <i>Iris Biotech</i> | Aminosäuren, Fmoc- und Seitenketten-geschützt |
| <i>J.T. Baker</i> | Natriumchlorid |
| <i>Merck</i> | Natriumazid, Tris-HCl |
| <i>Proligo</i> | Dimethylformamid (DMF) |
| <i>Quiagen</i> | Ni-NTA-Agarose |
| <i>Roth</i> | Isopropylthiogalactosid (IPTG) |
| <i>Roche Applied Science</i> | Tablette Protease Inhibitor Cocktail Mix EDTA-frei |
| <i>Sigma-Aldrich</i> | Farnesylmonophosphat (FMP), Farnesyldiphosphat (FDP), 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) |
| <i>R. C. Treatt</i> | (-)-Germacren D (40%ig) |

Tabelle 23: Verwendete Lösungsmittel und Puffer.

| Bezeichnung | Zusammensetzung |
|----------------------------------|---|
| CaCl ₂ -Lösung | 0.1 M CaCl ₂ in ddH ₂ O, sterilfiltriert |
| Coomassie-Entfärbelösung | 0.3% Tween-20 in ddH ₂ O |
| Coomassie-Färbelösung | 75 g (NH ₄) ₂ SO ₄ , 20 g H ₃ PO ₄ , 1 g Coomassie BB R (250 mL) |
| <i>d</i> TBS | 50 mM Tris- <i>d</i> ₁₁ -HCl, 300 mM NaCl, 20 mM NaN ₃ , D ₂ O, pH 7.8 |
| Enzym-Assay-Puffer 1 | 15 mM MOPSO, 1 mM MgCl ₂ , 2 mM DTT, 1 mM Natriumascorbat, 6 mM Natrium <i>ortho</i> -Vanadat, pH 7.0 |
| Enzym-Assay-Puffer 2 | 50 mM TBS, 10 mM MgCl ₂ |
| His-Tag-Elutions-Puffer | 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, 0.1 % (<i>w/v</i>) Triton100, 0.5 mM Phenylmethylsulfonylfluorid oder 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail Mix EDTA-frei, pH 8 |
| His-Tag-Lyse-Puffer | 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0.1 % (<i>w/v</i>) Triton ₁₀₀ , pH 8 |
| His-Tag-Wasch-Puffer | 50 mM NaH ₂ PO ₄ , 300 mM NaCl, 40 mM Imidazol, 0.1 % (<i>w/v</i>) Triton100, pH 8 |
| Isopentenylthiogalactosid-Lösung | 1 M Isopentenylthiogalactosid in ddH ₂ O, sterilfiltriert |
| LB-Amp-Medium | LB-Medium, 100 mg/L Ampicillin |
| LB-Medium | 1% Bacto-Tryptone, 0.5 Hefe-Extrakt, 170 mM NaCl in H ₂ O, pH 7.3, autoklaviert |
| LB-Medium-Platten | LB-Medium, 1.5% Agar-Agar |
| MPBS | 2% Milchpulver (<i>w/v</i>), PBS |
| PBS | 10 mM Natriumphosphat, 120 mM NaCl, pH 7.4 |
| Sammelgel-Puffer (4x) | 0.5 M Tris-HCl, 0.4 % SDS, pH 6.8 |
| SDS Fixierlösung | ddH ₂ O, Ethanol, Essigsäure 5:4:1 (<i>v/v/v</i>) |
| SDS Laufpuffer (5x) | 124 mM Tris-HCl, 0.96 M Glycin, 0.5 % SDS, pH 8.3 |
| SDS Probenpuffer (2x) | 200 mM Tris-HCl, 8% SDS, 0.4% Bromphenolblau, 40% Glycerol |
| SOC-Medium | 2% Bacto-Trypton, 0.5% Hefe-Extrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 20 mM Glucose, autoklaviert |
| TBS (Tris-Puffer, 10x) | 100 mM Tris-HCl, 1.5 M NaCl, 40 mM NaN ₃ , pH 7.8 |
| Trenngelpuffer (4x) | 1.5 M Tris-HCl, 0.4 % SDS, pH 8.8 |

Tabelle 24: Verwendete Geräte.

| Software | Version | Hersteller |
|----------------------|--|---|
| GC | Fractovap 4160 | <i>Carlo Erba Instruments</i> |
| | GC 8000 | <i>Carlo Erba Instruments</i> |
| GC-MS | GC: HP 5890 MS: VG 70-250S | GC: <i>Hewlett-Packard</i> MS: <i>VG Analytics</i> |
| Lyophylle | Alpha 1-2 | <i>Christ</i> |
| MALDI-TOF-MS | Biflex III | <i>Bruker Daltonics</i> |
| NMR 500 MHz | DRX500 (11.67 Tesla; inverser 5 mm Tripelresonanz-Probenkopf mit z-Gradient) | <i>Bruker BioSpin</i> |
| NMR 700 MHz | DRX500 (16.35 Tesla; inverser 5 mm Tripelresonanz-Cryo- Probenkopf mit z-Gradient) | <i>Bruker BioSpin</i> |
| pH-Meter | pH 526 | <i>WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH</i> |
| Photometer | Spectronic BioMate 3 | <i>Thermo Scientific</i> |
| | NanoDrop ND-1000 | <i>Thermo Scientific</i> |
| Präparative GC | modifizierter Varian 1400 | <i>Varian Incorporated</i> |
| Reinstwasseranlage | Ultra Clear UV 18.2 M Ω | <i>SGwater</i> |
| RP-HPLC | BioCad Sprint Perfusions Chromatography System | <i>PerSeptive Biosystems</i> |
| SDS-PAGE | LKB-2050 MIDGET | <i>Hoefer Scientific Instruments</i> |
| Speedvac | SpeedVac SC110 | <i>Savant</i> |
| SPR | Biacore T100 | <i>GE Healthcare Biacore</i> |
| Szintillationszähler | 2500 TR Liquid Szintillation Analyzer | <i>Packard-Canberra</i> |
| Ultrazentrifuge | Optima LE-80K | <i>Beckmann Coulter</i> |
| UV/Vis | BioPhotometer | <i>Eppendorf</i> |
| Western-Blot | Trans-Blot [®] SD Transfer-Cell | <i>BioRad</i> |
| Zentrifugen | 5804R, 5417 R | <i>Eppendorf</i> |

Tabelle 25: Verwendete Verbrauchsmaterialien. GC-Säulen, für die kein Hersteller angegeben ist, wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wilfried A. König hergestellt.

| Material | Produkt | Hersteller |
|---------------------------|--|--------------------------------------|
| Biacore Sensorchip | CM5 | <i>Biacore</i> |
| GC-Säule (analytisch) | CpSil-5/CPSil-19, 25 m | <i>Macherey und Nagel</i> |
| | Heptakis(6- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl)- β -cyclodextrin in OV 1701 (1:1, w/w), 25 m | |
| GC-Säule (präparativ) | stainless steel-Säule (2.00 m \times 4.3 mm) mit 6.9 % Heptakis(6- <i>O</i> - <i>tert</i> -butyldimethylsilyl-2,3-di- <i>O</i> -methyl)- β -cyclodextrin in Polysiloxan SE 52 (1:1, w/w) auf Chromosorb W-HP | |
| Kieselgel | Kieselgel 60 | <i>Merck</i> |
| NMR-Röhrchen | 3 mm NMR-Röhrchen für das Bruker Match™ System | <i>Hilgenberg</i> |
| | 5 mm single-use NMR-Röhrchen | <i>Norell Inc.</i> |
| Pipetten | Research® (variabel) | <i>Eppendorf</i> |
| Pipettenspitzen | Biosphere® Pipettenspitzen | <i>Sarstedt</i> |
| Polypropylen-Säulen | Ni-NTA <i>gravity flow columns</i> | <i>Quiagen</i> |
| Spin-Tubes | Ni-NTA <i>spin columns</i> | |
| Szintillations-Zähl-Tube | Reaktionsgefäße für Szintillationszähler | <i>Sarstedt</i> |
| RP-Säule (analytisch) | EC250/4 Nucleodur C18 Pyramid | <i>Macherey und Nagel</i> |
| RP-Säule (präparativ) | VP250/21 Nucleodur C18 Pyramid | <i>Macherey und Nagel</i> |
| Western-Blot Membran | Protran® Nitrocellulose Membran | <i>Schleicher & Schuell</i> |
| Zentrifugalkonzentratoren | Vivaspin® 6, MWCO 10000 | <i>Sartorius Stedim Biotech S.A.</i> |

Tabelle 26: Verwendete Software. Sofern keine Angabe erfolgt, wurde ein Standard PC benutzt.

| Methode | Version/Computer | Hersteller |
|-------------------------|---|----------------------------------|
| Biacore T100 Control | Version 1.1.1 | <i>GE Healthcare Biacore</i> |
| Biacore T100 Evaluation | Version 1.1.1 | <i>GE Healthcare Biacore</i> |
| DeepView | Version 4.0 | <i>SIB</i> |
| Massfinder | Version 2.3 | |
| OriginPro | Version 7.5G | <i>OriginLab Corporation</i> |
| R | Version 2.7.2 | <i>The R Foundation</i> |
| SYBYL | Version 8.0.3.08176 HP-xw4100-Workstation (<i>Hewlett-Packard</i>) | <i>Tripes</i> |
| TOPSPIN | Version 1.3 und 2.1 HP-xw4100-Workstation (<i>Hewlett-Packard</i>) | <i>Bruker BioSpin</i> |
| XWINNMR | Version 3.1 Workstations O ₂ , Octane (<i>Silicon-Graphics</i>) | <i>Bruker BioSpin</i> |

8.2 Vektor für die Transformation der (+)-Germacren D Synthase

Als Expressionsvektor wurde pRSET A von Invitrogen verwendet, der einen T7-Promotor sowie eine C-terminale His-Tag-Sequenz enthält. Eine Selektion gegenüber nicht transformierten Bakterienzellen erfolgt mittels eines Ampicillin-Resistenz-Gens (Abbildung 82).

Der in dieser Arbeit verwendeten Vektor (A8) war bereits mit dem Gen für die (+)-Germacren D Synthase ligiert und wurden von Dr. Iris Fransson (geb. Altug) zur Verfügung gestellt.²⁷

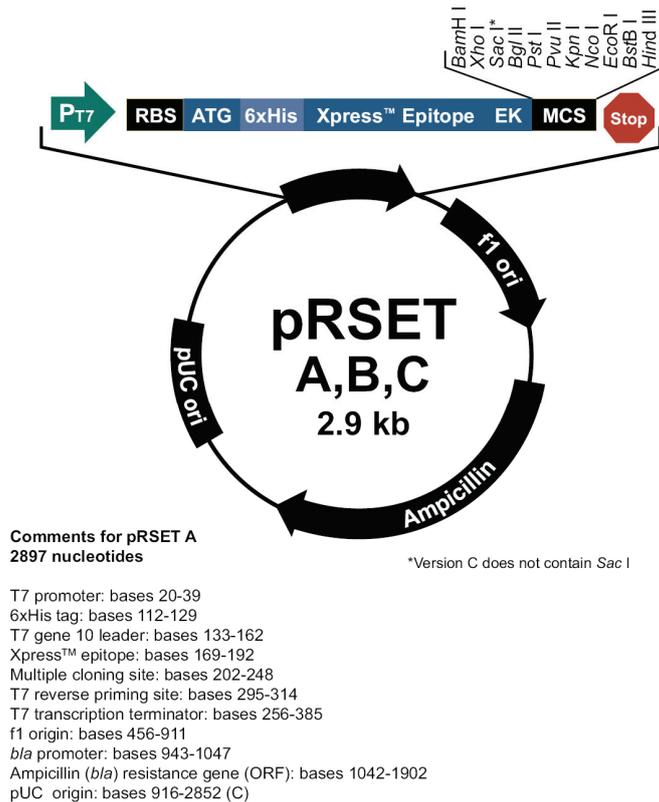


Abbildung 82: DNA-Karte des in dieser Arbeit verwendeten Expressionsvektors pRSET A.

8.3 Molekularbiologische und Proteinchemische Methoden

8.3.1 Herstellung kompetenter *E. coli* BL21DE3 Zellen

Die Expression der (+)-Germacren D Synthase wurde in dem *E. coli* Stamm BL21(DE3)pLysS durchgeführt, der unter anderem eine hoch effiziente Proteinexpression unter der Kontrolle eines T7-Promotors erlaubt. Die Zellen wurden in einer tiefgefrorenen Stock-Lösung aufbewahrt. Vor dem Beginn einer Expression wurden Zellen aus der Stock-Lösung auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Eine isolierte Kolonie der BL21(DE3)pLysS-Zellen wurde in 3-4 ml flüssigem LB-Medium unter Schütteln und bei 37 °C über Nacht inkubiert. 100 µL der Über-Nacht-Flüssigkultur wurden in 10 mL LB-Medium verdünnt und bei 37 °C und unter Schütteln bis zu einer Zelldichte von 0.5 (OD₆₀₀) inkubiert. Die Zellen wurden bei 2000 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Anschließend wurden die Zellen in 4.5 mL 0.1 M eiskalter CaCl₂-Lösung resuspendiert (Vortex) und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min bei 2000 g) wurden die Zellen dann in 0.9 ml eiskalter 0.1 M CaCl₂-Lösung durch Fingerschnippen resuspendiert.

100 μL der Suspension wurden in ein Tube überführt und mit 1 μL Plasmid A8 versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte ein 30 s langer Hitzeschock bei 42 °C im Inkubator (ohne Schütteln). Nach 2 min erneutem Kühlen auf Eis wurde die Suspension mit 0.9 mL SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Zellsuspension wurde dann auf 4-12 LB-Amp-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

8.3.2 Protein-Expression

Die mit dem Plasmid A8 transformierten Zellen wurden von den LB-Amp-Platten abgestrichen und in 50 mL LB-Amp-Medium suspendiert bis eine Zelldichte OD_{600} von 0.5 erreicht wurde. Nach Zugabe von 250 μL einer 1M Isopropylthiogalactosid-Lösung (IPTG) wurden die Zellen über Nacht bei 16 °C und 180 rpm inkubiert. Die Expressionsansätze, die in dieser Arbeit durchgeführt wurden lagen zwischen 50 und 750 mL.

8.3.3 Zellaufschluss und Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Alle Zell- und Proteinlösungen wurden durchgehend auf Eis gehalten. Die Mengenangaben beziehen sich auf einen Expressionsansatz von 50 mL.

Die aus 8.3.2 erhaltene Zellsuspension wurde bei 2000 g für 8 min zentrifugiert. Die Zellen wurden dann in 0.5 mL His-Tag-Lyse-Puffer suspendiert und anschließend für 6 Zyklen je 10 s (nach jeweils 30 s Pause) mit Ultraschall behandelt. Zur Abtrennung des Zell-Lysats wurde für 5 min bei 14000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde zunächst mit 0.2 mL Ni-NTA-Argarose für eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend auf eine *gravity flow column* gegeben. Nach ablaufen des His-Tag-Lyse-Puffers wurde zweimal mit je 1.5 mL His-Tag-Wasch-Puffer gespült und anschließend zweimal mit je 1 mL His-Tag-Elutions-Puffer eluiert. Die Enzymausbeuten lagen in dem Bereich von 4-6 mg pro L Expressionsansatz.

8.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Analyse der Proteinreinigung wurde das Prinzip der diskontinuierlichen pH-Elektrophorese angewandt, die durch den Einsatz von zwei Gelsystemen schärfere Banden erzeugt (Sammel- und Trenngel). Der pH-Wert zwischen den Systemen unterscheidet sich um zwei Einheiten, wodurch eine Fokussierung der Proteinbanden bei Eintritt in das Trenngel erfolgt. Die Trennung erfolgte über ein 7.5%-iges Polyacrylamidgel. Die Lösung für das Trenngel wurde entsprechend der Zusammensetzung aus Tabelle 27 hergestellt und in einer Größe von 90x60 mm gegossen (für fünf Gele). Anschließend wurde die Lösung mit 500 μL Isopropanol überschichtet und zur

Polymerisation bei RT für 90 min stengelassen. Das Isopropanol wurde abgegossen und das Trenngel mit der Sammelgellösung überschichtet (Zusammensetzung Tabelle 27). Zur Erzeugung der Probenaschen wurde in dieses ein Teflonkamm gesteckt. Nach weiteren 90 min für die Auspolimerisation wurde der Kamm entfernt, die Gele getrennt und mit ddH₂O gewaschen.

Zur Abschätzung des Molekulargewichtes wurden bei nachfolgender Comassie-Färbung des Gels 2-4 µL eines ungefärbten Proteinstandards in einer der Probenaschen aufgetragen. Für die Durchführung eines anschließenden Western-Blots wurde der entsprechend gefärbte (*pre-stained*) Standard ausgewählt. 10 µL der zu untersuchenden Fraktionen aus der Ni-NTA-Affinitätschromatographie wurden mit Probenpuffer (nicht-reduzierend 2x) im Verhältnis 1:1 vermennt und für 1 min auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Fraktionen in die entsprechenden Probenaschen eingefüllt. Das Gel wurde in eine Elektrophoresebox geklemmt und diese mit Laufpuffer befüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 50 mA durchgeführt.

Tabelle 27: Zusammensetzung des Trenn- und Sammelgels der SDS-PAGE.

| Gelsystem | Zusammensetzung |
|------------------|--|
| Trenngel 7.5%-ig | 7.5 mL Acrylamid-Stammlösung 7.5 mL Trenngelpuffer (4x) 30 µL Tetramethylethylendiamin (TEMED) auf 30 mL mit ddH ₂ O auffüllen |
| Sammelgel | 1.5 mL Acrylamidlösung 3.75 mL Sammelgelpuffer (4x) 15 µL Tetramethylethylendiamin (TEMED) 105 µL Ammoniumpersulfat (APS) bis 15 mL mit ddH ₂ O auffüllen |

8.3.5 Comassie-Färbung

Vor der Färbung des Gels, wurden die Banden für 30 min in der SDS-Fixierlösung fixiert. Das Gel wurde anschließend dreimal mit ddH₂O für 5 min gewaschen. Der Comassie-Färbelösung wurden frisch 15 mL Ethanol (96%-ig) zugefügt und das Gel über Nacht darin angefärbt. Das Gel wurde dann für 1 h in der Comassie-Entfärberlösung entfärbt.

8.3.6 Western-Blot

Für den Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran wurde zunächst ein 90x60 mm großes Stück der Membran zurechtgeschnitten. Der Transfer erfolgte horizontal mit einer *Semi-Dry*-Blot-Apparatur. Die Membran und acht Lagen Filterpapier wurden mit Transferpuffer getränkt. Auf die unten liegende Platinelektrode (Anode) wurde eine Schicht der Filterpapiere (4 Lagen) gelegt. Darauf folgten die Membran, das SDS-PAGE-Gel und eine zweite Schicht Filterpapiere (4 Lagen). Nach Auflegen der zweiten Platinelektrode (Kathode) wurde eine konstante Stromstärke von 0.8 mA/cm^2 angelegt und der Transfer nach 1.5 h beendet.

8.3.7 Immunoprinting

Um die Banden derjenigen Proteine mit einem His-Tag sichtbar zu machen, wurde die Membran zunächst für 30 min in einer 5%-igen MPBS-Lösung blockiert. Anschließend wurde die Membran über Nacht mit einem Maus-Anti-penta-His-Antikörper in 2%-iger MPBS-Lösung (1:2500) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde ein Ziege-Anti-Maus-IgG-AP-Konjugat in 2%-iger MPBS-Lösung (1:5000) zugegeben und für 1 h inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x) mit PBS wurde der Membran Detektionslösung zugefügt. Nach ausreichender Entwicklungszeit wurde mit ddH₂O gewaschen und an der Luft getrocknet.

8.3.8 Umpufferung der Enzymlösungen

Zum Umpuffern der (+)-GDS-Lösungen aus dem His-Tag-Elutionspuffer wurden die Zentrifugalkonzentratoren Vivaspin mit einem MWCO von 10000 verwendet. Diese wurden zunächst viermal mit 4 mL ddH₂O durch Zentrifugation gespült, um das zur Konservierung der Membran enthaltene Glycerol zu entfernen. Für die Herstellung von Enzymstammlösungen für die Enzymassays und für die SPR-Untersuchungen wurde die Membran ein weiteres Mal mit 4 mL TBS gespült. Für die Herstellung der Stammlösungen für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden zwei weitere Waschvorgänge mit je 4 mL D₂O und 4 mL *d*TBS durchgeführt. Der Austausch des Puffers der Proteinlösung wurde in vier Zentrifugationsschritten durchgeführt. Im Anschluss wurde die Konzentration photometrisch nach Pace *et al.* bestimmt.¹¹²

8.4 Enzymassays

8.4.1 GC/MS detektiertes Enzymassay

200 μL des His-Tag aufgereinigten Enzyms wurden mit 800 μL Enzym-Assay-Puffer 1 verdünnt. Der Lösung wurden 2 μL einer 10 mM FDP-Lösung (50%Ethanol in 200 mM wässriger Ammoniumcarbonat-Lösung, v/v) zugefügt. Das Assay wurde mit 1 mL Pentan überschichtet und für 1 h bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurde das Assay gevortext, kurz zentrifugiert (Phasentrennung) und die Pentanphase abgetrennt. Die wässrige Phase wurde erneut mit 1 mL Pentan extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über eine kurze Säule mit Aluminiumoxid und Magnesiumsulfat filtriert. Vor der GC/MS-Analyse wurde die organische Phase im leichten Stickstoffstrom auf ca. 10 μL eingeeengt.

8.4.2 Radiochemisches Enzymassay

20 μL des His-Tag aufgereinigten Enzyms wurden mit 80 μL Enzym-Assay-Puffer 1 oder 2 verdünnt. Die Lösung wurde mit 2 bzw. 5 μL einer 1 mM FDP-Lösung (50%Ethanol in 200 mM wässriger Ammoniumcarbonat-Lösung, v/v) und mit 5 μL einer 1:10 verdünnten [$1\text{-}^3\text{H}(\text{n})$]-FDP-Lösung (555-740 GBq/mmol, 15-20 Ci/mmol, 7.4 MBq/mL, 200 $\mu\text{Ci/mL}$ von Amersham Biosciences) versetzt. Das Assay wurde mit 1 mL Hexan überschichtet und für 1 h inkubiert. Die Temperatur betrug typischerweise 30 °C. Um zu testen, ob die Enzymaktivität auch bei niedrigeren Temperaturen erhalten bleibt, wurden einige Messungen bei Raumtemperatur durchgeführt. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde das Assay gevortext, kurz zentrifugiert und 750 μL der organischen Phase in ein Tube überführt, welches ca. 40 mg Flash Silica Gel enthielt. Nach erneutem vortexen wurde das Gemisch für 10 min bei 12 000 g zentrifugiert. 500 μL der Hexanphase wurde in ein Szintillations-Zähl-Tube überführt und mit 3.5 mL Szintillationsflüssigkeit Ultima Gold versetzt. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 1 bzw. 5 min. Die Radioaktivität wurde in der Einheit cpm bzw. dpm ausgelesen. Im Folgenden sind die Daten und Bedingungen der durchgeführten Messungen ausgeführt.

1. Messreihe

Die (+)-GDS wurde entsprechend den Vorschriften 8.3.1 und 8.3.2 exprimiert. Mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie (8.3.3) wurde eine 5.2 μM (+)-GDS-Lösung gewonnen und diese im His-Tag-Elutionspuffer bei 4 °C gelagert. Im Anschluss an die Messung am Tag 1 nach der Enzymexpression wurde ein Teil der Lösung in TBS umgepuffert. Aus dieser

Lösungen wurden vier 1.8 μM (+)-GDS-Lösungen in TBS mit unterschiedlichen Verdünnungen hergestellt - 75 mM (7.5 \times), 50 mM (5 \times), 30 mM (3 \times), 15 mM (1.5 \times). Die Proben wurden ebenfalls bei 4 °C gelagert. Die Assays wurden nach Vorschrift im Enzymassaypuffer 1 bei 30 °C durchgeführt (Einfachbestimmung).

Tabelle 28: 1. Messreihe, durchgeführt im Enzymassaypuffer 1 bei 30 °C. Der Messzeitraum betrug 1 min, die Radioaktivität wurde in cpm gemessen (Einfachbestimmung).

| Tage Nach der Expression | 0 | 1 | 3 | 6 |
|--------------------------|---------|---------|--------|--------|
| His-Tag Elutionspuffer | 14186.6 | 5634.78 | 87.26 | 0 |
| 75 mM TBS | □ | □ | 599.02 | 352.72 |
| 50 mM TBS | □ | □ | 972.56 | 455.12 |
| 30 mM TBS | □ | □ | 585.13 | 259.14 |
| 15 mM TBS | □ | □ | 609.25 | 186.39 |

2. Messreihe

Tabelle 29: 2. Messreihe, durchgeführt im Enzymassaypuffer 1 bei 30 °C. Der Messzeitraum betrug 1 min, die Radioaktivität wurde in cpm gemessen (Einfachbestimmung).

| Tage Nach der Expression | 1 | 4 |
|--------------------------|---------|--------|
| 75 mM TBS | 1812.33 | 57.12 |
| 50 mM TBS | 1063.81 | 122.14 |
| 30 mM TBS | 722.60 | 47.12 |

Die (+)-GDS wurde entsprechend den Vorschriften 8.3.1 und 8.3.2 exprimiert. Im Anschluss an die Expression und Reinigung wurde das Enzym direkt umgepuffert. Es wurden drei 2.2 μM Enzymlösungen in TBS mit unterschiedlicher Pufferverdünnung hergestellt (7.5 \times , 5 \times und 2.5 \times) und diese bei 4 °C gelagert. Nach einem und nach vier Tagen wurden Assays im Enzymassaypuffer 1 bei 30 °C durchgeführt.

3. Messreihe

Die (+)-GDS wurde entsprechend den Vorschriften 8.3.1 und 8.3.2 exprimiert. Die mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gewonnene Enzymlösung wurde im Anschluss in TBS umgepuffert. Es wurden drei 2.6 μM Lösungen mit unterschiedlicher Verdünnung an TBS

hergestellt (7.5×, 5× und 2.5×) und diese bei 4 °C gelagert. Nach einem, vier, sechs und acht Tagen wurden Assays im Enzymassaypuffer 2 (5×TBS) bei 30 °C durchgeführt.

Tabelle 30: 3. Messreihe, durchgeführt im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C. Der Messzeitraum betrug 1 min, die Radioaktivität wurde in dpm gemessen (Zweifachbestimmung).

| Tage Nach der Expression | 1 | 4 | 6 | 8 |
|--------------------------|---------|---------|---------|---------|
| 75 mM TBS | 3842.2 | 2279.29 | – | – |
| | 1871.37 | 0 | – | – |
| 50 mM TBS | 0 | 5419.71 | 3128.64 | 2837.61 |
| | 8481.52 | 4111.56 | 1844.57 | 1704.04 |
| 30 mM TBS | 4713.33 | 2065.16 | – | – |
| | 1284.8 | 2007.55 | – | – |

4.-6. Messreihe

Die (+)-GDS wurde entsprechend den Vorschriften 8.3.1 und 8.3.2 exprimiert und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie (8.3.3) aufgereinigt. Im Anschluss wurde das Enzym in TBS umgepuffert und vier Lösungen mit unterschiedlicher Enzymkonzentration (2.3, 4.6, 7.7 und 10.2 µM) und gleicher Pufferverdünnung hergestellt (50 mM). Die Proben wurden bei 4 °C und bei Raumtemperatur gelagert. Am ersten und am zweiten Tag nach der Expression wurden Assays mit den im Kühlschrank gelagerten Proben durchgeführt. Je ein Assay wurde bei 30 °C und bei Raumtemperatur durchgeführt. Am dritten, vierten und sechsten Tag nach der Expression wurden die unterschiedlich gelagerten Proben vermessen.

Tabelle 31: 4. Messreihe, durchgeführt im Enzymassaypuffer 2. Der Messzeitraum betrug 1 min, die Radioaktivität wurde in dpm gemessen (Einfachbestimmung). Die Temperatur betrug während des Assays: ¹⁾ 30 °C bzw. ²⁾ RT.

| Tage Nach der Expression | 1 ¹⁾ | 1 ²⁾ | 2 ¹⁾ | 2 ²⁾ |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 2.3 µM (+)-GDS | 20788.3 | 31789.8 | 16843.4 | 11586.1 |
| 4.6 µM (+)-GDS | 25677.6 | 21264.8 | 14146.6 | 11200.1 |
| 7.7 µM (+)-GDS | 21160.7 | 26627.7 | 10997.7 | 18359.1 |
| 10.2 µM (+)-GDS | 30120.8 | 30242.7 | 5315.57 | 15925.4 |

Tabelle 32: 5. Messreihe, durchgeführt im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C. Die Enzymproben wurden bei 4 °C gelagert. Der Messzeitraum betrug 1 min, die Radioaktivität wurde in dpm gemessen (Einfach- und Zweifachbestimmung).

| Tage Nach der Expression | 3 | 4 | 6 |
|--------------------------|---------|---------|---------|
| 2.3 µM (+)-GDS | 25137.3 | 23174.9 | 14031.7 |
| | – | 28774.6 | 13528.2 |
| 4.6 µM (+)-GDS | 28222 | 26783 | 14421.5 |
| | – | 24116.7 | 22204.2 |
| 7.7 µM (+)-GDS | 18083.7 | 20556 | 0 |
| | – | 0 | 0 |
| 10.2 µM (+)-GDS | 26641.5 | 22296.6 | 23180.1 |
| | – | 23801.8 | 0 |

Tabelle 33: 6. Messreihe, durchgeführt im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C. Die Enzymproben wurden bei RT gelagert. Der Messzeitraum betrug 1 min, die Radioaktivität wurde in dpm gemessen (Einfach- und Zweifachbestimmung).

| Tage Nach der Expression | 3 | 4 | 6 |
|--------------------------|---------|---------|---------|
| 2.3 µM (+)-GDS | 30157.7 | 12850.8 | 19559 |
| | – | 22862.7 | 21222.4 |
| 4.6 µM (+)-GDS | 18907.8 | 0 | 19424.1 |
| | – | 26592.2 | 22626.3 |
| 7.7 µM (+)-GDS | 28183.7 | 20451.4 | 23279.1 |
| | – | 27817.5 | 16385 |
| 10.2 µM (+)-GDS | 36439.7 | 26574.7 | 16510.7 |
| | – | 26180 | 17226.5 |

7. Messreihe

Nachdem die (+)-GDS aus einem weiteren Expressionsansatz erfolgreich mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie gewonnen werden konnte, wurde die erhaltene Lösung direkt in 50 mM TBS umgepuffert. Es wurden fünf Lösungen mit unterschiedlicher Enzymkonzentration (0.9, 1.7, 2.6, 5.6 und 9.7 µM) hergestellt. Die Proben wurden bei 4 °C gelagert. Nach einem, vier, sechs und acht Tagen wurden Assays im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C durchgeführt. Da in dem vorangegangenen Assays keine Abhängigkeit von der Enzymkonzentration beobachtet wurde, wurde die Zugabe an radioaktiv unmarkierten FDP

von 2 μL auf 5 μL erhöht. Zusätzlich wurde der Messzeitraum im Szintillationszähler auf fünf Minuten erhöht, um statistische Fehler zu minimieren.

Tabelle 34: 7. Messreihe, durchgeführt im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C. Der Messzeitraum betrug 5 min, die Radioaktivität wurde in dpm gemessen (Zweifachbestimmung).

| Tage Nach der Expression | 1 | 4 | 6 | 8 |
|---------------------------|---------|---------|---------|---------|
| 0.9 μM (+)-GDS | 0 | 390.8 | 294.9 | 380.67 |
| | 296.82 | 545.57 | 604.34 | 205.18 |
| 1.7 μM (+)-GDS | 3341.02 | 2116.38 | 1906.84 | 824.89 |
| | 0 | 2574.07 | 1314.21 | 594.96 |
| 2.6 μM (+)-GDS | 0 | 5419.71 | 3128.64 | 2837.61 |
| | 8481.52 | 4111.56 | 1844.57 | 1704.04 |
| 5.4 μM (+)-GDS | 0 | 8737.47 | 6340.17 | 4891.48 |
| | 12267.6 | 4709.91 | 8613.77 | 5475.07 |
| 9.7 μM (+)-GDS | 251.18 | 14857.1 | 12223.8 | 12375.9 |
| | 24398 | 13152.3 | 11766.8 | 11049.8 |

8.-9. Messreihe

Die (+)-GDS wurde entsprechend den Vorschriften 8.3.1 und 8.3.2 exprimiert und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie (8.3.3) aufgereinigt. Im Anschluss wurde das Enzym direkt umgepuffert. Es wurden drei Enzymlösungen mit unterschiedlicher Konzentration (1.5, 3.0 und 4.5 μM) in TBS (50 mM) hergestellt. Jede Probe wurde in zwei Hälften zu je 200 μL aufgeteilt und jeweils eine Hälfte mit 4 μL einer 100 mM DTT-Lösung in ddH₂O versetzt. Die Konzentration an DTT in den Enzymproben betrug 2 mM. Alle Proben wurden bei 4 °C gelagert. Nach einem, drei, fünf und sieben Tagen wurden Assays im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C durchgeführt.

Tabelle 35: 8. Messreihe, durchgeführt im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C. Der Messzeitraum betrug 5 min, die Radioaktivität wurde in dpm gemessen (Einfach- und Zweifachbestimmung).

| Tage Nach der Expression | 1 | 3 | 5 | 7 |
|--------------------------|---------|---------|---------|---------|
| 1.5 µM (+)-GDS, ohne DTT | 13863 | 12058.5 | 21373.9 | 20445.2 |
| | 11676.6 | 13200.9 | 17181.9 | – |
| 3.0 µM (+)-GDS, ohne DTT | 8217.93 | 11391.7 | 20682.7 | 24458.4 |
| | 9856.17 | 12686.6 | 26763.9 | – |
| 4.5 µM (+)-GDS, ohne DTT | 10468.9 | 13774.2 | 17443.4 | 24677.9 |
| | 10903.8 | 13191.7 | 22768.1 | – |

Tabelle 36: 9. Messreihe, durchgeführt im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C. Der Messzeitraum betrug 5 min, die Radioaktivität wurde in dpm gemessen (Einfach- und Zweifachbestimmung).

| Tage Nach der Expression | 1 | 3 | 5 | 7 |
|--------------------------|---------|---------|---------|---------|
| 1.5 µM (+)-GDS, 2 mM DTT | 12083.3 | 15592.2 | 22543.8 | 26825.2 |
| | 11150 | 13075.3 | 19047.4 | – |
| 3.0 µM (+)-GDS, 2 mM DTT | 11236.2 | 11518 | 20376.1 | 24854.9 |
| | 10914.8 | 14516 | 13631 | – |
| 4.5 µM (+)-GDS, 2 mM DTT | 13621.2 | 14861.5 | 25095.7 | 28504.8 |
| | 15049.5 | 15522.2 | 18569.8 | – |

10. Messreihe

Die (+)-GDS wurde entsprechend den Vorschriften 8.3.1 und 8.3.2 exprimiert und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie (8.3.3) aufgereinigt. Im Anschluss wurde das Enzym in TBS umgepuffert. Es wurden eine 1.5 µM Enzymlösungen in 50 mM TBS hergestellt und in fünf Teile zu je 200 µL aufgefällt. Eine der Proben wurde direkt bei 4 °C gelagert. Von den übrigen vier Proben wurde jeweils eine mit 2% bzw. 5% DMSO (v/v) und jeweils eine mit 2% bzw. 5% TFE (v/v) versetzt. Anschließend wurden diese Proben ebenfalls bei 4 °C gelagert. Nach einem und nach drei Tagen wurden Assays im Enzymassaypuffer 2 (TBS, 50 mM) bei 30 °C durchgeführt.

Tabelle 37: 10. Messreihe, durchgeführt im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C. Der Messzeitraum betrug 5 min, die Radioaktivität wurde in dpm gemessen (Zweifachbestimmung).

| Tage Nach der Expression | 1 | 3 |
|--------------------------|---------|---------|
| kein Zusatz | – | 16947.2 |
| | – | 13614.2 |
| 2% DMSO | 26175.9 | 10954.4 |
| | 8813.88 | 0 |
| 5% DMSO | 24102.7 | 14909.7 |
| | 19015 | 20396.6 |
| 2% TFE | 341.22 | – |
| | 213.35 | – |
| 5% TFE | 34.64 | – |
| | 143.02 | – |

11. Messreihe

Die (+)-GDS wurde entsprechend der Vorschriften 8.3.1 und 8.3.2 exprimiert und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie (8.3.3) aufgereinigt. Die somit erhaltene Enzymlösung wurde in *d*TBS umgepuffert. Ein Teil der Probe wurde für STD-Experimente verwendet. Der Rest der Probe wurde bei 12 °C gelagert (Messtemperatur der NMR-Experimente). Nach einem, nach drei und nach fünf Tagen wurden Assays im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C durchgeführt.

Tabelle 38: 11. Messreihe, durchgeführt im Enzymassaypuffer 2 bei 30 °C. Der Messzeitraum betrug 5 min, die Radioaktivität wurde in dpm gemessen (Zweifachbestimmung).

| Tage Nach der Expression | 1 | 3 | 5 |
|---------------------------------|---------|---------|---------|
| 5 μ M (+)-GDS, <i>d</i> TBS | 15466 | 11460.8 | 24920.8 |
| | 19051.3 | 11770.8 | 14333.9 |

8.5 Synthese des Heptapeptids $^{182}\text{KTKCVIM}^{188}$ aus dem C-Terminus von K-Ras4B

8.5.1 Synthese des Peptids

Für den gewählten Ansatz von 50 μM Peptid wurde die entsprechende Menge eines Rink-Amid-AM-Harzes (47 mg) in eine Glasfritte eingewogen. Das Harz wurde zum Quellen mit DMF bedeckt und für 24 h geschüttelt. Anschließend wurden die Fmoc-Schutzgruppen abgespalten, indem das Harz je zweimal mit Piperidin/DMF (2 mL, 1:4) versetzt und für 1 h geschüttelt wurde. Für die nachfolgenden Kupplungsreaktionen wurden die Aminosäuren im vierfachen Überschuss (200 μM) und der Aktivator TBTU und die Base DIPEA in fünffachen Überschuss (250 μM) eingesetzt. Die Aminosäure wurde in einer Lösung aus dem Aktivator und DIPEA in möglichst wenig DMF gelöst und diese Lösung direkt auf das Harz gegeben. Dann wurde für mindestens 2 h geschüttelt, die Kupplung wurde jeweils zweimal mit frischer Reaktionslösung durchgeführt. Zur Acetylierung der nicht reagierten Aminofunktionen wurde das Harz mit einer 10%-igen Lösung von Essigsäureanhydrid in DMF bedeckt und für 1 h geschüttelt. Das *capping* wurde jeweils zweimal durchgeführt. Die Lösung wurde entfernt und das Harz 8-mal mit DMF gespült, um das Acetylierungsreagenz vollständig zu entfernen. Zur Entschützung der *N*-terminalen Fmoc-Gruppe wurde erneut je zweimal mit 2 mL Piperidin/DMF (1:4) für 1 h geschüttelt. Im Anschluss wurde der Ansatz je zweimal mit 8 mL DMF gespült. Für eine photometrische Bestimmung der Ausbeute des Kupplungsschrittes wurden die vereinigten Abspalt- und Waschlösungen in einem mit Aluminiumfolie umwickelten Kolben aufgefangen. Von der Lösung wurden 100 μL entnommen und auf 2 mL mit DMF verdünnt. Anhand der Gleichung 16 wurde die Ausbeute berechnet.

$$\frac{\text{Extinktion}}{7.95} \cdot 400 = X \mu\text{mol Peptid}$$

Gleichung 16: Formel zur photometrischen Bestimmung der Ausbeute des synthetisierten Peptids.

Die einzelnen Arbeitsschritte, das Kuppeln, das *capping* und das Entschützen der Fmoc-Gruppe wurden für jede Aminosäure in der beschriebenen Weise wiederholt.

8.5.2 Abspaltung vom Harz und Reinigung

Zur Abspaltung des Peptids vom Harz und zur Entschützung von den Seitenkettenschutzgruppen wurde das Harz mit 2 mL einer TFA/TIPS/H₂O-Lösung (95:5:1) für 1 h geschüttelt. Die Lösung wurde in einem Rundkolben aufgefangen und das Harz mit TFA gewaschen. Der Abspaltprozess wurde wiederholt und nach Entfernen der Abspalllösung im Vakuum das Rohprodukt erhalten.

Das Rohprodukt wurde mit *tert*-Butylmethylether überschichtet und die entstandene Suspension anschließend dreimal mit je 3 mL H₂O ausgeschüttelt. Die vereinigten wässrigen Phasen wurden gefriergetrocknet. Das hierbei erhaltene Rohpeptid (37 mg, 45 µmol) wurde durch *RP*-HPLC an einer präparativen Säule gereinigt. Als mobile Phase wurden ein Gradientenprogramm zwischen den entgasten Eluenten A (95% H₂O/ 5% MeCN/ 0.1% TFA) und B (95% MeCN/ 5% H₂O/ 0.1% TFA) verwendet. Die Trennung erfolgte bei RT mit einer Flussrate von 20 mL/min. Das Peptid wurde in 1 mL Eluent A aufgenommen. Ungelöste Rückstände wurden durch Filtration vor der Injektion abgetrennt. Die Detektion erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 215 nm. Die Ausbeute des aufgereinigten Peptids betrug 12.6 mg (15.3 µmol).

8.6 Vorbereitung der Ligandproben

8.6.1 Herstellung von FMP- und FDP-Stammlösungen für die Enzymassays, SPR- und NMR-Experimente

Die käuflich erworbenen Proben von Farnesylmonophosphat und -diphosphat (200 µg) wurden in einer 200 mM Ammoniumcarbonat-Lösung in H₂O/Methanol (1:1) geliefert. Für die verschiedenen durchgeführten Experimente musste das Lösungsmittel entsprechend deren Anforderungen ausgetauscht werden. Zur Entfernung des Lösungsmittels wurde Gefriertrocknung an einer *Speedvac* angewandt. Anschließend wurde der Rückstand in dem neuen Lösungsmittel wieder aufgenommen. Für die Berechnung der richtigen Lösungsmittelmenge ist die Masse der Ammoniumsalze der Farnesylphosphate zugrunde gelegt worden (FDP: 336.4 g/mol, C₁₅H₃₃N₂O₄P; FDP: 433.4 g/mol, C₁₅H₃₇N₃O₇P₂). Die Hergestellten Lösungen und ihre Anwendung finden sich in der Tabelle 39.

Tabelle 39: Hergestellte Lösungen von Farnesylmono- und Farnesyldiphosphat.

| Substanz | Konzentration [mM] | Lösungsmittel | Menge [μL] | Anwendung |
|----------|--------------------|---|-------------------------|----------------------------------|
| FMP | 0.5 | TBS | 1200 | SPR |
| FMP | 0.5 | 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ in D_2O | 1200 | NMR-Charakterisierung |
| FMP | 2.5 | <i>d</i> TBS | 240 | STD-NMR |
| FMP | 10 | <i>d</i> TBS | 60 | STD-NMR |
| FDP | 0.5 | TBS | 920 | SPR |
| FDP | 1 | 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ in $\text{ddH}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (1:1) | 460 | radiochemisches Enzymassay |
| FDP | 10 | 200 mM $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ in $\text{ddH}_2\text{O}/\text{EtOH}$ (1:1) | 46 | GC/MS det. Enzymassay |
| FDP | 2.5 | <i>d</i> TBS | 184 | STD-NMR NMR-Charakterisierung |
| FDP | 10 | <i>d</i> TBS | 46 | STD-NMR |

8.6.2 Herstellung der (-)-Germacren D Lösungen für die Löslichkeitsversuche

Die Probe eines ätherischen Öls mit einer angereicherten Menge an (-)-Germacren D (40%-ig) wurde von der Firma *R.C. Treatt* zur Verfügung gestellt. Das ätherische Öl wurde für eine weitere Anreicherung mittels präparativer Gaschromatographie in Diethylether aufgenommen. Die präparative Reinigung erfolgte isotherm bei 110 °C. Dazu wurden 30 bis 60 μL des gelösten ätherischen Öls auf die Säule aufgetragen. Die Fraktionssammlung erfolgte anhand eines parallel aufgezeichneten Chromatogramms. Die Eluate wurden mit einem Teflonschlauch aufgefangen, der in ein Kühlbad mit flüssigem Stickstoff tauchte. Die Schläuche wurden mit $\text{DMSO-}d_6$ gespült, anschließend erfolgte eine Trocknung der Proben über Natriumsulfat. Anhand eines analytischen Laufes konnte eine Anreicherung auf 81% festgestellt werden (Temperaturprogramm: 50 °C, 3.0 °C/min, 230 °C). Zur Bestimmung der Konzentration wurde eine Vergleichsprobe von Aromadendren mit derselben Summenformel ($\text{C}_{15}\text{H}_{24}$) und mit bekannter Konzentration (10 mg/ml) eingespritzt. Die Konzentration der (-)-GD Stammlösung wurde durch Vergleich der Peakflächen beider Proben zu 12 mg/mL ermittelt. Zusätzlich erfolgte eine Enantiomerenzuordnung durch Bestimmung des optischen Drehsinns und mittels enantioselektiver GC gegen eine Vergleichsprobe an (+)-GD isotherm

bei 120 °C. Alle Gaschromatographen wurden mit Wasserstoff als Trägergas bedient (Injektortemperatur: 200 °C; Detektortemperatur: 250 °C).

Die NMR-Proben für die Artefaktmessungen mit einer 0.44 mM Konzentration an (-)-GD wurden nach der Tabelle 40 zusammentitriert.

Tabelle 40: Übersicht über die hergestellten (-)-GD Lösungen. ¹⁾ in *t*TBS

| DMSO- <i>d</i> ₆ Gehalt [%] | Menge der (-)-GD Stammlösung [μ L] | Menge DMSO- <i>d</i> ₆ [μ L] | Menge D ₂ O [μ L] |
|---|--|---|--------------------------------------|
| 20 | 1.5 | 38.5 | 160 |
| 15 | 1.5 | 28.5 | 170 |
| 10 | 1.5 | 18.5 | 180 |
| 7.5 | 1.5 | 13.5 | 185 |
| 5 | 1.5 | 8.5 | 190 |
| 5 ¹⁾ | 1.5 | 8.5 | 190 ¹⁾ |

8.7 SPR-Bindungsstudien

Für die Immobilisierung der (+)-Germacren D Synthase auf einem CM5-Chip wurde zunächst die beiden Flusszellen Fc1 und Fc2 angewählt, die während der Messung als Referenzzelle und Messzelle dienen sollten. Die Zellen wurde bei einer Flussrate von 10 μ L/min für 18 min mit einer frisch angesetzten Lösung (1:1, *v/v*) aus 0.05 M *N*-Hydroxysucchinimid (NHS) und 0.2 M *N*-(3-Dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) aktiviert. Daraufhin erfolgte die Belegung der Messzelle (Fc2) durch das Überleiten einer 0.8 pM Lösung des Enzyms in Acetat-Puffer (54 mg/ml) bei einer Flussrate von 10 mL/min. Die Belegung wurde solange durchgeführt, bis kaum weiterer Massenzuwachs auf der Chipoberfläche zu verzeichnen war. Beide Flusszellen wurden im Anschluss durch eine 1 M Ethanolaminlösung blockiert, die bei einer Flussrate von 10 μ L/min für 12 min über die Zelle geleitet wurde. Um die Belegung des Chips mit Protein zu ermitteln, wurde die Differenz der RU-Werte vor und nach der Immobilisierung (inkl. Blockierung) gebildet. Dabei entspricht die Zunahme des RU-Wertes um ein RU einem Massenzuwachs von 1 pg. Die Differenz vor und nach der Immobilisierung betrug Δ RU = 4625, was einer Stoffmenge von 70 pmol Enzym entspricht.

Der Versuch der Coimmobilisierung der (+)-GDS und von FMP wurde bezüglich der Aktivierung und Blockierung identisch durchgeführt. Für die Immobilisierung wurde eine 1.3 pM Enzymlösung (84 mg/mL) mit 200 pM FMP in Acetat-Puffer frisch hergestellt und über die Chipoberfläche geleitet. Die Injektion erfolgte fünfmal für je 600 s. Da bei den ersten beiden Injektionen mit einer Flussrate von 10 mL/min nur ein geringer Massenzuwachs zu beobachten war, wurde die Flussrate anschließend auf 20 mL/min erhöht. Die Differenz vor und nach der Immobilisierung betrug $\Delta\text{RU} = 1200$. Insgesamt gelang nur die Immobilisierung von 18 pmol Enzym.

Tabelle 41: Konzentrationsreihen, mit denen die SPR-Messungen durchgeführt wurden.

| Ligand | Konzentrationen [μM] | | | | | | | | |
|--------|-----------------------------------|----|----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| FMP | 0.005 | 10 | 25 | 50 | 75 | 100 | 150 | 250 | 500 |
| FDP | 0.005 | 10 | 25 | 50 | 75 | 100 | 150 | 250 | 500 |

Für die Durchführung der Messung wurden Ligandlösungen im jeweiligen Messzyklus für 60 s bei einer Flussrate von 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ injiziert. Nach jeder Injektion wurde für 300 s gewartet, bis die Basislinie des RU-Wertes wieder erreicht war. Es wurden Ligandlösungen entsprechend der in Tabelle 41 angegebenen Konzentrationsreihen vermessen.

8.8 Charakterisierungen der verwendeten Liganden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wechselwirkung von Proteinen mit vier Liganden untersucht, dem Farnesylmonophosphat, dem Farnesyldiphosphat, dem (+)-Germacren D und dem Peptid $^{182}\text{KTKCVIM}^{188}$. Die Charakterisierung erfolgte mit verschiedenen Pulssequenzen und in verschiedenen Lösungsmittelsystemen. Die Pulssequenzen wurden entsprechend den zu charakterisierenden Substanzklassen gewählt. Für das FMP und das FDP war ausschließlich eine Zuordnung der Protonenresonanzen notwendig, da es sich hierbei um Literaturbekannte und gekaufte Substanzen handelt. Das Protonenspektrum von FMP in wässriger Lösung konnte mithilfe eines H,H-COSY und NOESY Spektrums vollständig aufgeklärt werden. Für das FDP erfolgte eine Zuordnung der Protonenresonanzen anhand eines NOESY-Spektrums und durch Vergleich der Daten mit dem FMP. Durch die Wahl verschiedener Lösungsmittel und Puffersysteme konnte gezeigt werden, dass diese keinen Einfluss auf die relative Lage der Resonanzsignale zueinander besitzen. Eine Zuordnung der

Protonenresonanzen für das Germacren D erfolgte über H,H-COSY, HSQC, HMBC und NOESY Spektren. Aufgrund der Verfügbarkeit wurde die Charakterisierung an dem (-)-Enantiomer durchgeführt. Die Zuordnung der ^1H -Signale von Germacren D erfolgte in $\text{DMSO-}d_6$, da in diesem Lösungsmittel mit höheren Konzentrationen gearbeitet werden konnte. Für die Lösungsmittelgemische $\text{D}_2\text{O}/\text{DMSO-}d_6$ wurden keine 2D-Experimente durchgeführt. Eine Zuordnung der Protonensignale war anhand des $\text{DMSO-}d_6$ -Spektrums möglich. Die Zuordnung der Protonenresonanzen einzelner Spinsysteme in einem Peptid erfolgt dagegen über den NH-Bereich eines TOCSY-Spektrums, die sequentielle Zuordnung je nach Molekülmasse über ein NOESY bzw. ROESY Spektrum. Damit die NH-Signale von Peptiden nicht gegen Deuterium austauschen, werden die Charakterisierungen in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei pH 3-4 durchgeführt. Aufgrund des hohen Einflusses, den der pH-Werte auf die relative Lage der Protonensignale besitzen kann, wurde eine zusätzliche Charakterisierung in $d\text{TBS}$ bei pH 7.8 durchgeführt. Eine Zuordnung der Peptid- ^{13}C -Resonanzsignale erfolgte in D_2O bei pH 7.

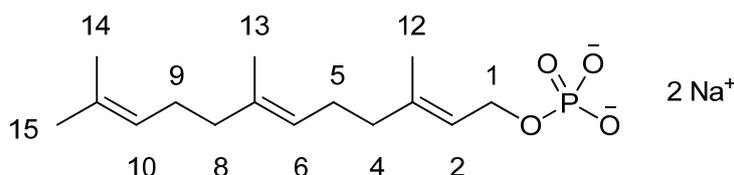
Die Proben wurden im 5 mm oder 3 mm Röhrrchen mit Füllvolumina von entsprechend 600 μL bzw. 200 μL vermessen. Die Aufnahme der Charakterisierungsspektren erfolgte mit Standard-Pulssequenzen von Bruker, sowohl am 500 MHz als auch am 700 MHz Spektrometer. Die Aufnahme der 1D-Experimente erfolgte mit 32 768 Datenpunkten. 2D Experimente wurden mit 128 oder 256 Inkrementen und 4096 Datenpunkten pro Inkrement akquiriert. Alle 2D-Experimente wurden je nach Pulsprogramm mit der Aufnahmetechnik echo-antiecho, QF, TPPI oder states-TPPI aufgenommen. Bei der Verwendung von *pulsed field gradients* wurde ein SINE.100 Puls mit einer Länge von 1 ms gewählt. Der *gradient recovery delay* wurde auf 100 μs eingestellt. Das Wassersignal wurde entweder durch Anwendung eines der Pulssequenz vorgelagerten Sättigungspulses (*presat*) oder mit Hilfe der WATERGATE-Sequenz oder der *excitation eculpting* Technik unterdrückt. Eine Auflistung der verwendeten Pulsprogramme und Aufnahmeparameter erfolgt für jede Verbindung im Einzelnen. Die Prozessierung der Spektren erfolgte mit der Software TOPSPIN. Zur Verbesserung der S/N -Verhältnisse wurde ein *zero-filling* angewendet. Die Spektren wurden auf das jeweilige Lösungsmittelsignal kalibriert.¹¹³ Für Spektren in D_2O wurde die Verschiebung des HDO Restsignals nach der Gleichung 17 berechnet.

$$\delta = 5.060 - 0.0122 T + 2.11 \times 10^{-5} T^2$$

Gleichung 17: Berechnung der Resonanzfrequenz des HDO-Signals. T : Temperatur in $^{\circ}\text{C}$.

Die Charakterisierung des Peptids $^{182}\text{KTKCVIM}^{188}$ mittels MALDI-TOF-MS wurde mit Dihydroxybenzol (DHB) als Matrix durchgeführt. Es wurden 0.6 μL der Matrix auf einen Probenhalter gegeben. Nach dem Trocknen der Matrix wurden 0.6 μL des Peptids auf die Matrix gegeben. Die Messung erfolgte im positiven Ionenmodus bei einer *attenuation* von 35 dB mit 50 Laserpulsen.

8.8.1 Farnesylmonophosphat



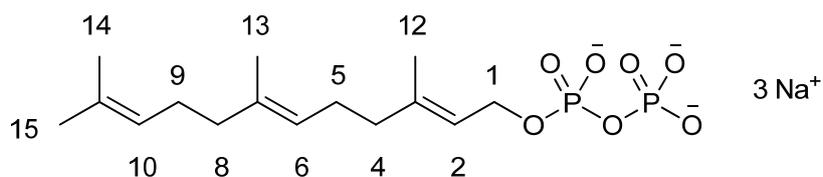
Das FMP wurde in einer Konzentration von 0.5 mM in D_2O vermessen. Aufgrund der Hydrolyseempfindlichkeit der Phosphatgruppe, wurde der Lösung 1 mM NH_4HCO_3 zugefügt. Die Aufnahme der Spektren erfolgte am 700 MHz Spektrometer bei 285 K und mit einem O1 von 3292 Hz. Die folgenden Pulsprogramme und Aufnahmeparameter wurden verwendet.

Tabelle 42: Pulsprogramme und Aufnahmeparameter zur Charakterisierung des Farnesylmonophosphats (700 MHz, 285 K, D_2O , 1 mM NH_4HCO_3).

| Experiment | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | Programmspezifische Parameter |
|--------------|-------------------|-------|---------------------|---|
| ^1H | <i>zgpr</i> | 64/4 | 10 | PL9: 49 dB |
| ^1H | <i>p3919gp</i> | 64/4 | 10 | P0: 40 μs P27: 40 μs D19: 150 μs |
| H,H-COSY | <i>cosydfphpr</i> | 32/16 | 10/10 | PL9: 52 dB |
| NOESY | <i>noesyphpr</i> | 64/16 | 10/10 | PL9: 52 dB |

^1H -NMR (700 MHz, 285 K, D_2O , 1 mM NH_4HCO_3): δ [ppm] = 1.58 (3H, *s*, H-14), 1.59 (3H, *s*, H-13), 1.65 (3H, *s*, H-15), 1.67 (3H, *s*, H-12), 1.99 (2H, *t*, $^3J = 7.4$ Hz, H-8), 2.05 (2H, *t*, $^3J = 7.6$ Hz, H-4), 2.09 (2H, *q*, $^3J = 7.4$ Hz, H-9), 2.13 (2H, *q*, $^3J = 7.4$ Hz, H-5), 4.26 (2H, *dd*, $^3J_{\text{HH}} = 7.2$ Hz, $^3J_{\text{HP}} = 4.8$ Hz, H-1), 5.15 (1H, *t*, $^3J = 7.2$ Hz, H-10), 5.20 (1H, *t*, $^3J = 7.3$ Hz, H-6), 5.40 (1H, *t*, $^3J = 7.0$ Hz, H-10).

8.8.2 Farnesyldiphosphat



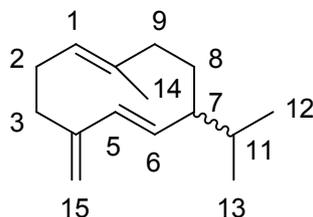
Das FDP wurde in einer Konzentration von 0.5 mM in *d*TBS/DMSO-*d*₆ (95:5) vermessen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte am 700 MHz Spektrometer bei 285 K und mit einem O1 von 3285 Hz. Die folgenden Pulsprogramme und Aufnahmeparameter wurden verwendet.

Tabelle 43: Pulsprogramme und Aufnahmeparameter zur Charakterisierung des Farnesyldiphosphats (700 MHz, 285 K, *d*TBS/DMSO-*d*₆ 95:5, pH 7.8).

| Experiment | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | Programmspezifische Parameter |
|----------------|-------------------|-------|---------------------|----------------------------------|
| ¹ H | <i>zgesgp</i> | 64/4 | 10 | SP1: 33.4 μs |
| NOESY | <i>noesyegpph</i> | 32/16 | 10/10 | SP1: 33.4 μs D8: 2 s |

¹H-NMR (700 MHz, 285 K, *d*TBS/DMSO-*d*₆ 95:5): δ [ppm] = 1.63 (3H, *s*, H-14), 1.63 (3H, *s*, H-13), 1.69 (3H, *s*, H-15), 1.73 (3H, *s*, H-12), 2.03 (2H, *t*, ³*J* = 7.4 Hz, H-8), 2.10 (2H, *t*, ³*J* = 7.6 Hz, H-4), 2.13 (2H, *q*, ³*J* = 7.4 Hz, H-9), 2.17 (2H, *q*, ³*J* = 7.4 Hz, H-5), 4.47 (2H, *dd*, ³*J*_{HH} = 7.2 Hz, ³*J*_{HP} = 4.8 Hz, H-1), 5.19 (1H, *t*, ³*J* = 7.2 Hz, H-10), 5.23 (1H, *t*, ³*J* = 7.3 Hz, H-6), 5.47 (1H, *t*, ³*J* = 7.0 Hz, H-10).

8.8.3 Germacren D



Das Germacren D wurde in einer Konzentration von 15 mM in DMSO-*d*₆ bzw. 0.44 mM in D₂O/DMSO-*d*₆ (95:5) und *d*TBS/DMSO-*d*₆ (95:5) vermessen. Die Aufnahme der Spektren erfolgten am 500 MHz Spektrometer bei 300 K und mit einem O1 von 1715 Hz.

Tabelle 44: Pulsprogramme und Aufnahmeparameter für die Charakterisierung des Germacren D. (500 MHz, Temperatur und Lösungsmittel wie angegeben)

| Experiment | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | O2 [Hz] | Programmspezifische Parameter |
|----------------|---------------------|--------|---------------------|----------|----------------------------------|
| ¹ H | <i>zg</i> | 64/4 | 10 | | |
| ¹ H | <i>zg</i> | 512/4 | 10 | | |
| ¹ H | <i>zgpr</i> | 512/4 | 10 | | PL9: 55 |
| ¹ H | <i>p3919gp</i> | 256/16 | 10 | | D19: 100 μs |
| ¹ H | <i>p3919gp</i> | 8/4 | 10 | | D19: 75 μs |
| COSY | <i>cosydfgpph19</i> | 48/16 | 8/8 | | D19: 100 μs PL9: 53.98 dB |
| NOESY | <i>noesygpph19</i> | 64/16 | 8/8 | | D19: 75 μs D8: 2 s |
| HSQC | <i>hsqcetgpsi</i> | 48/16 | 8/160 | 10055.39 | CNST2: 145 CPDPRG2: Garp |
| HMBC | <i>hmbcglpndqf</i> | 48/16 | 8/160 | 11312.31 | CNST2: 145 CNST13: 10 |

¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 0.77 (3H, *d*, ³*J* = 6.9 Hz, H-13/12), 0.83 (3H, *d*, ³*J* = 6.8 Hz, H-12/13), 1.44 - 1.39 (3H, *m*, H-8, H-11), 1.45 (3H, *s*, H-14), 1.91 - 1.86 (1H, *m*, H-2b), 2.03 - 1.96 (1H, *m*, H-7), 2.09 - 2.03 (1H, *m*, H-3b), 2.24 - 2.14 (2H, *m*, H-9), 2.35 - 2.26 (1H, *m*, H-2a), 2.42 - 2.35 (1H, *m*, H-3a), 4.75 (2H, *s*, H-15), 5.07 (1H, *dd*, ³*J* = 4.4 Hz, ³*J* = 11.2 Hz, H-1), 5.22 (1H, *dd*, ³*J* = 10.0 Hz, ³*J* = 16.1 Hz, H-6), 5.77 (1H, *d*, ³*J* = 16.2 Hz, H-5).

¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*₆, 300 K) δ = 15.5 (*q*, C-14), 19.0 (*q*, C-12/13), 20.6 (*q*, C-12/13), 25.9 (*t*, C-8), 28.6 (*t*, C-2), 31.9 (*d*, C-11), 33.7 (*t*, C-3), 40.0 (*t*, C-9), 52.1 (*d*, C-7), 109.3 (*t*, C-15), 129.2 (*d*, C-1), 129.3 (*s*, C-10), 133.0 (*d*, C-6), 135.1 (*d*, C-5), 148.0 (*s*, C-4).

¹H-NMR (500 MHz, D₂O/DMSO-*d*₆, 95:5, 300 K) δ = 0.84 (3H, *d*, ³*J* = 6.8 Hz, H-13/12), 0.89 (3H, *d*, ³*J* = 6.7 Hz, H-12/13), 1.39 - 1.47 (3H, *m*, H-8, H-11), 1.50 (3H, *s*, H-14), 1.88 - 2.11 (3H, *m*, H-2b, H-7, H-3b), 2.23 - 2.29 (2H, *m*, H-9), 2.32 - 2.44 (2H, *m*, H-2a, H-3a), 4.72 (2H, *s*, H-15, vom Wassersignal überlagert), 5.12 (1H, *dd*, ³*J* = 4.0 Hz, ³*J* = 10.7 Hz, H-1), 5.21 (1H, *dd*, ³*J* = 9.9 Hz, ³*J* = 15.9 Hz, H-6), 5.76 (1H, *d*, ³*J* = 15.9 Hz, H-5).

^1H -NMR (500 MHz, *d*TBS/DMSO-*d*₆, 95:5, 285 K) δ = 0.83 (3H, *d*, 3J = 6.8 Hz, H-13/12), 0.89 (3H, *d*, 3J = 6.7 Hz, H-12/13), 1.38 - 1.46 (3H, *m*, H-8, H-11), 1.49 (3H, *s*, H-14), 1.88 - 2.10 (3H, *m*, H-2b, H-7, H-3b), 2.23 - 2.29 (2H, *m*, H-9), 2.31 - 2.43 (2H, *m*, H-2a, H-3a), 4.72 (2H, *s*, H-15, vom Wassersignal überlagert), 5.21 (1H, *dd*, 3J = 9.9 Hz, 3J = 15.9 Hz, H-6), 5.75 (1H, *d*, 3J = 15.9 Hz, H-5).

8.8.4 $^{182}\text{KTKCVIM}^{188}$

Das Heptapeptid $^{182}\text{KTKCVIM}^{188}$ wurde in einer Konzentration von 15 mM in $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ (9:1) bei pH 3.8 vermessen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte am 500 MHz Spektrometer bei 300 K und einem O1 von 2347 Hz. Die verwendeten Pulsprogramme und Aufnahmeparameter sowie die chemischen Verschiebungen und Kopplungskonstanten sind in den Tabellen 45-47 aufgelistet.

Tabelle 45: Pulsprogramme und Aufnahmeparameter für die Charakterisierung des Peptids $^{182}\text{KTKCVIM}^{188}$ (500 MHz, 285 K, $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ 9:1, pH 3.8)

| Experiment | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | Programmspezifische Parameter |
|--------------|---------------------|-------|---------------------|--------------------------------------|
| ^1H | <i>zgesgp</i> | 256/4 | 10 | SP1: 41.2 dB |
| ^1H | <i>zggpw5</i> | 256/4 | 10 | D19: 200 μs |
| TOCSY | <i>mlevgpwh5</i> | 40/16 | 10/10 | D19: 200 μs D9: 100 ms |
| ROESY | <i>roesygpw5.dt</i> | 40/16 | 10/10 | D19: 200 μs D8: 300 ms |

Tabelle 46: ^1H -NMR chemische Verschiebungen der Peptids $^{182}\text{KTKCVIM}^{188}$ (in ppm).

| | NH | H α | β | β' | γ | γ' | δ | δ' | ϵ, ϵ' | ζ |
|------|-------|------------|---------|----------|----------|-----------|----------|-----------|-----------------------|---------|
| K182 | □ | 4.060 | 1.871 | 1.871 | 1.433 | 1.433 | 1.672 | 1.672 | 2.970 | 7.582 |
| T183 | 8.712 | 4.289 | 4.097 | – | 1.196 | – | – | – | – | – |
| K184 | 8.656 | 4.263 | 1.760 | 1.760 | 1.390 | 1.390 | 1.661 | 1.661 | 2.952 | 7.557 |
| C185 | 8.526 | 4.456 | 2.839 | 2.839 | 1.968 | – | – | – | – | – |
| V186 | 8.469 | 4.066 | 1.996 | – | 0.871 | 0.871 | – | – | – | – |
| I187 | 8.382 | 4.118 | 1.795 | – | 1.454 | 1.145 | 0.855 | – | – | – |
| M188 | 8.589 | 4.431 | 1.988 | 1.988 | 2.498 | 2.582 | – | – | 2.050 | – |

Tabelle 47: Kopplungskonstanten zwischen den NH- und α -Protonen der Aminosäuren

| | Lysin ¹ | Threonin | Lysin ² | Cystein | Valin | Isoleucin | Methionin |
|--|--------------------|----------|--------------------|---------|-------|-----------|-----------|
| ³ J _{NH-Hα} [Hz] | – | 6.9 | 6.5 | 7.1 | 8.1 | 8.5 | 7.6 |

Das Heptapeptid ¹⁸²KTKCVIM¹⁸⁸ wurde in einer Konzentration von 10 mM in *d*TBS vermessen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte am 500 MHz Spektrometer bei 300 K und einem O1 von 2346 Hz. Eine Auflistung der verwendeten Pulsprogramme und Aufnahmeparameter sowie die chemischen Verschiebungen kann den Tabellen 48 und 49 entnommen werden.

Tabelle 48: Pulsprogramme und Aufnahmeparameter zur Charakterisierung des Peptids ¹⁸²KTKCVIM¹⁸⁸ (500 MHz, *d*TBS, pH 7.8).

| Experiment | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | Programmspezifische Parameter |
|----------------|--------------------------------|-------|---------------------|----------------------------------|
| ¹ H | <i>zgesgp</i> | 256/4 | 10 | SP1: 41.2 dB |
| ¹ H | <i>zggpw5</i> | 256/4 | 10 | D19: 200 μ s |
| TOCSY | <i>mlevgp^hw5</i> | 64/16 | 10/10 | D19: 200 μ s D9: 100 ms |
| ROESY | <i>roesygp^w5.dt</i> | 64/16 | 10/10 | D19: 200 μ s D8: 300 ms |

Tabelle 49: ¹H-NMR chemische Verschiebungen des Peptids ¹⁸²KTKCVIM¹⁸⁸ (in ppm).

| | H α | β | β' | γ | γ' | δ | δ' | ϵ, ϵ' |
|------|------------|---------|----------|----------|-----------|----------|-----------|-----------------------|
| K182 | 3.827 | 1.803 | 1.803 | 1.464 | 1.464 | 1.720 | 1.720 | 3.024 |
| T183 | 4.355 | 4.191 | – | 1.245 | – | – | – | – |
| K184 | 4.345 | 1.821 | 1.821 | 1.473 | 1.473 | 1.720 | 1.720 | 3.024 |
| C185 | 4.442 | 2.881 | 2.881 | – | – | – | – | – |
| V186 | 4.141 | 2.118 | – | 0.961 | 0.961 | – | – | – |
| I187 | 4.144 | 1.892 | – | 1.516 | 1.249 | 0.923 | – | – |
| M188 | 4.479 | 2.065 | 2.065 | 2.562 | 2.662 | – | – | 2.116 |

Das Heptapeptid ¹⁸²KTKCVIM¹⁸⁸ wurde in einer Konzentration von 7.5 mM in D₂O vermessen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte am 700 MHz Spektrometer bei 300 K und

einem O1 von 3289 Hz. Die verwendeten Pulsprogramme und Aufnahmeparameter sowie die chemischen ^1H - und ^{13}C -Verschiebungen sind in den Tabellen 50-52 aufgelistet.

Tabelle 50: Pulsprogramme und Aufnahmeparameter für die Charakterisierung des Peptids $^{182}\text{KTKCVIM}^{188}$ (700 MHz, D_2O , pH 7).

| Experiment | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | O2 [Hz] | Programmspezifische Parameter |
|---------------------|--------------------|--------|---------------------|-----------------|---------------------------------------|
| ^1H | <i>zgpr</i> | 8/4 | 10 | | PL9: 75 dB |
| ^{13}C -BB | <i>zgdc</i> | 8192/4 | 200 | O1: 17604.78 | CPDPRG2: waltz16 |
| TOCSY | <i>mlevphpr</i> | 16/16 | 9/9 | | PL9: 55 dB D9: 80 ms |
| COSY | <i>cosygspr</i> | 16/16 | 9/9 | | PL9: 75 dB |
| HSQC | <i>inviedetgs</i> | 64/128 | 6/100 | 8802.39 | D4: 0.00178571 s D24: 0.00357143 s |
| HMBC | <i>inv4gplprnd</i> | 64/16 | 6/190 | 16724.54 | D2: 0.00345000 s |

Tabelle 51: ^1H -NMR chemische Verschiebungen des Peptids $^{182}\text{KTKCVIM}^{188}$ (in ppm).

| | H α | β | β' | γ | γ' | γ'' | δ | δ' | ϵ, ϵ' |
|------|------------|---------|----------|----------|-----------|------------|----------|-----------|-----------------------|
| K182 | 4.094 | 1.914 | 1.914 | 1.466 | 1.466 | – | 1.716 | 1.716 | 3.004 |
| T183 | 4.340 | 4.142 | – | 1.227 | – | – | – | – | – |
| K184 | 4.308 | 1.824 | 1.769 | 1.420 | 1.420 | – | 1.674 | 1.674 | 2.979 |
| C185 | 4.505 | 2.867 | 2.867 | – | – | – | – | – | – |
| V186 | 4.112 | 2.042 | – | 0.922 | 0.894 | – | – | – | – |
| I187 | 4.163 | 1.844 | – | 1.481 | 1.193 | 0.889 | 0.838 | – | – |
| M188 | 4.469 | 2.079 | 1.995 | 2.518 | 2.612 | – | – | – | 2.085 |

Tabelle 52: ^{13}C -NMR chemische Verschiebungen des Peptids $^{182}\text{KTKCVIM}^{188}$ (in ppm).

| | C=O | C α | β | γ | γ' | δ | ϵ |
|------|-------|------------|---------|----------|-----------|----------|------------|
| K182 | 169.9 | 52.8 | 30.4 | 21.2 | – | 26.3 | 38.9 |
| T183 | 171.1 | 59.2 | 67.0 | 18.9 | – | – | – |
| K184 | 173.1 | 53.7 | 30.4 | 22.0 | – | 26.4 | 39.1 |
| C185 | 171.3 | 55.5 | 25.1 | – | – | – | – |
| V186 | 172.8 | 59.6 | 30.0 | 17.8 | 18.4 | – | – |
| I187 | 173.4 | 58.0 | 35.8 | 24.5 | 14.6 | 9.7 | – |
| M188 | 175.7 | 52.1 | 30.3 | 29.3 | – | – | 14.1 |

8.9 T_1 -Relaxationsmessungen

Die T_1 -Relaxationszeiten der Farnesylphosphate und des Germacren D wurden mit der *inversion recovery* Pulssequenz bestimmt (Pulsprogramm: *tlir*, *tliresgp.th*). Als *recovery delays* (vdlist) wurden die Zeiten $t = 0.01, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10$ s gewählt. Die Auswertung der *inversion recovery* Experimente erfolgte nach Durchführung von Phasen- und Basislinienkorrektur sowie manueller Integration in TOPSPIN 1.3, durch Auftragung der absoluten Integrale gegen den *recovery delay* mit der Software Origin 7.5. Die Daten wurden entsprechend der Gleichung 5 *gefittet* (vgl. S. 23). Die Ergebnisse sind im Abschnitt 4.3 (S. 71) dargestellt.

Tabelle 53: Pulsprogramme und Parameter der *inversion recovery* Experimente (500 MHz¹ bzw. 700 MHz²; 285 K³ bzw. 300 K⁴; DMSO- d_6 ⁵, D₂O⁶, $d\text{TBS}$ ⁷, $d\text{TBS/DMSO-}d_6$ 80:20⁸ bzw. $d\text{TBS/DMSO-}d_6$ 95:5⁹).

| Verbindung | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | O1 [Hz] | Programmspezifische Parameter |
|--------------------------|--------------------|-------|---------------------|---------|----------------------------------|
| (-)-GD ^{1,4,5} | <i>tlir</i> | 64/4 | 8 | 1749.55 | D1: 10 s |
| (-)-GD ^{1,4,7} | <i>tlir</i> | 64/4 | 8 | 2353.24 | D1: 10 s |
| (-)-GD ^{1,3,8} | <i>tlir</i> | 128/4 | 8 | 2353.24 | D1: 10 s |
| FMP ^{1,3,6} | <i>tlir</i> | 32/4 | 8 | 2353.24 | D1: 10 s |
| FDP ^{2,3,6,7,9} | <i>tliresgp.th</i> | 32/4 | 10 | 3286.00 | SP1: 34 dB D1: 10 s |

8.10 STD-Experimente

Für die Aufnahme von STD-Spektren wurden Pulsprogramme verwendet, die der Pseudo-2D-Variante des STD-Experiments entsprechen. Hierbei werden die FIDs der *off*- und *on-resonance* Spektren in zwei Inkrementen eines seriellen Files gespeichert. Mit Hilfe des AU-Programms *splitser* lassen sich die FIDs trennen. Der FID des STD-Spektrums lässt sich nachträglich durch Differenzbildung aus den beiden Anderen erzeugen. Für die Bestimmung der STD-Intensitäten wurden die drei FIDs wiederum in einem seriellen 2D-File gespeichert und in F2 fouriertransformiert. Nach einer Basislinienkorrektur wurden die Spektren separiert und in drei 1D-Files gespeichert. Die 2D-Datenmatrix ist wichtig, um eine unterschiedliche Skalierung der Fouriertransformation bei der Prozessierung der Spektren zu vermeiden. Die Ligandsignale in allen drei Spektren wurden integriert und die STD-Intensitäten aus den Differenzen der *off*- und *on-resonance* Spektren bestimmt. Die Integrale aus den STD-Spektren dienen zum Vergleich gegen die Differenzintegrale. Eine weitere Methode für die Bestimmung der STD-Intensitäten bestand darin, das *off-resonance* Spektrum direkt mit dem STD-Spektrum im *multiple spectra mode* zu vergleichen. Dabei wird ein Signal des einen Spektrums auf das entsprechende Signal in dem anderen Spektrum skaliert. Aus dem Skalierungsfaktor lassen sich direkt die STD-Intensitäten ableiten. Die zweite Methode wurde bei niedrigen *S/N*-Verhältnissen angewandt, da die Werte aus der Integrationsmethode in diesem Fall deutliche Schwankungen aufweisen können.

8.10.1 Sättigungsexperimente

Um geeigneten Sättigungsbedingungen für die (+)-GDS und die Farnesyltransferase zu finden wurden 1.25-4.50 μM Proteinlösungen in *d*TBS hergestellt (Tabellen 54-56).

Tabelle 54: Untersuchung der Sättigungsbedingungen an einer 4.5 μM (+)-GDS-Lösung (700 MHz, 285 K, *d*TBS, pH 7.8).

| Exp. | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] | L7 | SP1 [dB] | <i>on-res</i> [kHz] | <i>off-res</i> [kHz] | Sättigung |
|------|-----------------------|--------|-------------|----|-------------|------------------------|-------------------------|-----------|
| 1 | <i>std19sp2d_4.bc</i> | 1024/8 | 14 | 39 | 45 | -0.7 | +40 | 7% |
| 2 | <i>std19sp2d_4.bc</i> | 1024/8 | 14 | 39 | 45 | -0.35 | +40 | 11% |
| 3 | <i>std19sp2d_4.bc</i> | 1024/8 | 14 | 39 | 45 | -0.1 | +40 | 18% |
| 4 | <i>std19sp2d_4.bc</i> | 1024/8 | 14 | 39 | 45 | +5.25 | +40 | 13-24% |
| 5 | <i>std19sp2d_4.bc</i> | 1024/8 | 14 | 39 | 45 | +5.6 | +40 | 10-22% |
| 6 | <i>std19sp2d_4.bc</i> | 1024/8 | 14 | 59 | 45 | -0.35 | +40 | 13% |
| 7 | <i>std19sp2d_4.bc</i> | 1024/8 | 14 | 59 | 45 | +5.25 | +40 | 15-30% |
| 8 | <i>std19sp2d_4.bc</i> | 1024/8 | 14 | 59 | 40 | +5.25 | +40 | 22-42% |
| 9 | <i>std19sp2d_4.bc</i> | 1024/8 | 14 | 79 | 45 | +5.25 | +40 | 17-33% |

Tabelle 55: Untersuchung der Sättigungsbedingungen an einer 1.25 μM (+)-GDS-Lösung (700 MHz, 285 K, *d*TBS, pH 7.8).

| Exp. | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] | D20 [s] | SP13 [dB] | <i>on-res</i> [kHz] | <i>off-res</i> [kHz] | Sättigung |
|------|-------------------------|--------|-------------|------------|--------------|------------------------|-------------------------|-----------|
| 1 | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 2048/4 | 16 | 2 | 40 | +5.25 | +40 | 20-30% |
| 2 | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 2048/4 | 16 | 2 | 35 | +5.25 | +40 | 25-40% |
| 3 | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 2048/4 | 16 | 3 | 35 | +5.25 | +40 | 20-45% |

Tabelle 56: Untersuchung der Sättigungsbedingungen an einer 2.5 μM FTase-Lösung (700 MHz, 285 K, *d*TBS, pH 7.8).

| Exp. | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] | D20 [s] | SP1 [dB] | <i>on-res</i> [kHz] | <i>off-res</i> [kHz] | Sättigung |
|------|-------------------------|--------|-------------|------------|-------------|------------------------|-------------------------|-----------|
| 1 | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 2048/4 | 16 | 2 | 40 | -0.7 | +40 | 30% |
| 2 | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 2048/4 | 16 | 2 | 35 | -0.7 | +40 | 35% |
| 3 | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 2048/4 | 16 | 2 | 32 | -0.7 | +40 | 38% |
| 4 | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 2048/4 | 16 | 2 | 35 | +5.25 | +40 | 30% |

8.10.2 Artefaktmessungen an (-)-Germacren D

Die Lösungen für die Artefaktmessungen wurden entsprechend der Tabelle 40 (S. 150) hergestellt. Keine der Messungen zeigte Artefaktssignale in den STD-Differenzspektren. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei 285 und 300 K und mit einem O1 von 2349 Hz am 500 MHz Spektrometer und 3289 Hz am 700 MHz Spektrometer. Die Pulsprogramme und Aufnahmeparameter sind in Tabelle 57 zusammengefasst.

Tabelle 57: Pulsprogramme und Aufnahmeparameter für Artefaktmessungen am verschiedenen 0.44 mM (□)-Germacren D-Lösungen.

| Experiment | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | Programmspezifische Parameter |
|------------|-----------------------|---------|------------------------|---|
| STD | <i>stdw5sp2d.bc</i> | 1536/8 | 10 | SP1: 45dB L7: 39 D19: 200 μ s <i>on-res</i> : -0.55/+3.75 kHz <i>off-res</i> : 57 kHz |
| STD | <i>std19sp2d_4.bc</i> | 20484/4 | 10 | SP1: 45dB L7: 39 D19: 115 μ s <i>on-res</i> : +5.25 kHz <i>off-res</i> : 40 kHz |

8.10.3 Artefaktmessungen an Farnesyldiphosphat

200 μ L einer 0.5 mM FDP-Lösung wurden in *d*TBS/DMSO-*d*₆ (95:5) in einem 3 mm Match-Röhrchen angesetzt und jeweils ein ¹H-NMR- und ein STD-Spektrum akquiriert. Anschließend wurde der Probe 2 μ L einer 100 mM MgCl₂-Lösung in *d*TBS zugefügt und ein ¹H-NMR- und ein STD-Spektrum mit identischen Parametern aufgenommen. Die Aufnahme der Spektren erfolgte bei 300 K und mit einem O1 von 3285 Hz. Die Pulsprogramme und Aufnahmeparameter sind in Tabelle 58 zusammengefasst, die Ergebnisse der Messung in Tabelle 59.

Tabelle 58: Pulsprogramme und Aufnahmeparameter für Artefaktmessungen am einer 0.5 mM Farnesyldiphosphat-Lösung (700 MHz, 285 K, *d*TBS/DMSO-*d*₆ 95:5, pH 7.8).

| Experiment | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | Programmspezifische Parameter |
|----------------|-------------------------|--------|------------------------|--|
| ¹ H | <i>zgesgp</i> | 256/4 | 10 | SP1: 33.4 dB |
| STD | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 1024/4 | 10 | SP1: 33.4 dB SP13: 45 dB D20: 3 s <i>on-res</i> : 5.25 kHz <i>off-res</i> : 40 kHz PL10/29: 120 dB D29: 0 ms L4: 1 TD(F1): 2 |

Tabelle 59: STD-Experimente von FDP (500 μM) zur Bestimmung von Artefakt-Intensitäten. Die Angaben sind in Prozent. Zuordnung der Signale: Abbildung 26, S. 51.

| <i>c</i> (FDP) [μM] | <i>c</i> (MgCl ₂) [mM] | H-1 | H-2 | H-4/ H-9 | H-5 | H-6 | H-8 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|------------------------|---------------------------------------|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| 500 | 0 | – | – | – | – | – | – | – | 0.4 | 0.4 | 0.6 | 0.4 |
| 500 | 1 | 5.2 | 8.3 | 4.9 | 4.9 | 7.6 | 5.8 | 9.4 | 8.4 | 8.4 | 10.3 | 7.3 |

Zu einer 50 μM Ethylenglycol-Lösung in 200 μL *d*TBS mit 0.1 mM MgCl₂ wurde jeweils 1.1 μL einer 2.5 mM FDP-Lösung in *d*TBS zugefügt. Nach fünf Zugaben an FDP wurde die Probe mit 2 μL einer 10 mM MgCl₂-Lösung in *d*TBS versetzt. Anschließend wurde die Konzentration an FDP durch dreimalige Zugabe von 1.1 μL und durch einmalige Zugabe von 4.4 μL aus der 2.5 mM Stamm-Lösung weiter erhöht. Nach jeder Zugabe erfolgte die Aufnahme von zwei ¹H-NMR-Spektren, jeweils eines vor und eines nach der Akquisition eines STD-NMR-Spektrums (Tabellen 60 und 61).

Tabelle 60: Pulsprogramme und Aufnahmeparameter für Artefaktmessungen an einer Farnesyldiphosphat-Lösung (700 MHz, 285 K, *d*TBS, pH 7.8, 0.05 mM Ethylenglycol).

| Experiment | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | Programmspezifische Parameter |
|----------------|-------------------------|-------|------------------------|--|
| ¹ H | <i>zgesgp</i> | 256/4 | 10 | SP1: 33.4 dB |
| STD | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 512/4 | 10 | SP1: 33.4 dB SP13: 45 dB D20: 2 s <i>on-res</i> : 5.25 kHz <i>off-res</i> : 40 kHz PL10/29: 120 dB D29: 0 ms L4: 1 TD(F1): 2 |

Tabelle 61: STD-Titration von Farnesyldiphosphat zur Bestimmung von Artefakt-Intensitäten. Die Angaben sind in Prozent. Zuordnung der Signale: Abbildung 26, S. 51.

| <i>c</i> (MgCl ₂) [mM] | <i>c</i> (FDP) [μM] | H-1 | H-2 | H-4/ H-9 | H-5 | H-6 | H-8 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|---------------------------------------|------------------------|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| 0.1 | 13.7 | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 0.1 | 27.2 | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 0.1 | 40.6 | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| 0.1 | 53.8 | – | – | – | – | – | – | – | – | 0.3 | 0.4 | 0.5 |
| 0.1 | 66.9 | – | – | – | – | – | – | – | – | 0.4 | 0.4 | – |
| 0.2 | 66.3 | – | – | – | – | – | – | – | 0.3 | 0.4 | 0.4 | – |
| 0.2 | 79.1 | – | – | – | – | – | – | – | 0.4 | 0.4 | 0.5 | 0.4 |
| 0.2 | 91.8 | – | – | – | – | – | – | – | 0.3 | 0.5 | 0.5 | 0.3 |
| 0.2 | 104.4 | – | – | – | – | – | – | – | 0.3 | 0.5 | 0.6 | 0.3 |
| 0.2 | 153.3 | 0.6 | 0.0 | 0.3 | 0.3 | 0.5 | 0.3 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.6 | 0.4 |

Um die Abhängigkeit der Intensitäten von Artefaktensignalen von den Aufnahmeparametern im STD-Experiment zu bestimmen, wurde eine 105.4 μM FDP-Lösung verwendet. Für die Probenvorbereitung wurden 8.8 μL einer 2.5 mM FDP-Lösung in *d*TBS, 2 μL einer 10 mM MgCl₂-Lösung in *d*TBS mit 198 μL *d*TBS vermengt. Die Messung erfolgte bei 285 K und einem O1 von 3286 Hz. Es wurden verschiedene Einstrahlpunkte und Sättigungsleistungen

gewählt und die Intensitäten der Artefaktssignale im STD-Differenzspektrum bestimmt. Anschließend wurde der Probe 2 μL DMSO- d_6 zugefügt, und die Messung für zwei ausgewählte Sättigungsleistungen bei einem Einstrahlpunkt von $\square 0.7$ ppm wiederholt (Tabellen 62-64).

Tabelle 62: Pulsprogramme und Aufnahmeparameter für Artefaktmessungen an einer 105.4 μM Farnesyldiphosphat-Lösung (700 MHz, 285 K, $d\text{TBS}$, 0.2 mM MgCl_2 , pH 7.8).

| Experiment | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | Programmspezifische Parameter |
|--------------|-------------------------|--------|------------------------|---|
| ^1H | <i>zgesgp</i> | 256/4 | 10 | SP1: 33.4 dB |
| STD | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 1024/4 | 10 | SP1: 34 dB D20: 2 s <i>off-res</i> : 40 kHz PL10/29: 120 dB D29: 0 ms L4: 1 TD(F1): 2 |

Tabelle 63: STD-Experimente zur Bestimmung von Artefakt-Intensitäten an einer 105.4 μM Farnesyldiphosphat-Lösung. Angaben in Prozent. Zuordnung der Signale: Abbildung 26, S. 51.

| <i>on-res</i> [kHz] | SP13 [dB] | H-1 | H-2 | H-4/ H-9 | H-5 | H-6 | H-8 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|------------------------|--------------|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| -0.7 | 35 | – | – | 0.7 | 0.9 | – | 0.5 | – | 0.8 | 0.9 | 0.8 | 0.6 |
| -0.7 | 31 | – | – | 1.1 | 1.1 | – | 1.0 | – | 1.6 | 1.6 | 1.3 | 1.1 |
| -0.7 | 28 | 0.9 | 1.6 | 2.0 | 2.4 | 1.3 | 2.0 | 2.3 | 2.7 | 2.6 | 2.1 | 2.1 |
| -0.7 | 25 | 1.4 | 1.4 | 3.6 | 3.6 | 2.1 | 3.1 | 1.2 | 4.8 | 4.2 | 3.3 | 3.4 |
| -1.05 | 35 | – | – | 0.4 | 0.6 | – | 0.0 | – | 0.7 | 0.9 | 0.9 | 0.6 |
| -1.05 | 30 | – | – | 1.3 | 1.1 | – | 1.0 | – | 1.5 | 1.4 | 1.5 | 1.3 |
| -1.4 | 25 | 1.3 | 1.9 | 2.2 | 2.6 | 0.6 | 1.9 | 1.5 | 2.8 | 2.5 | 2.2 | 2.1 |

Tabelle 64: STD-Experimente zur Bestimmung von Artefakt-Intensitäten an einer 105.4 μM Farnesyldiphosphat-Lösung. Die Angaben sind in Prozent. Zuordnung der Signale: Abbildung 26, S. 51.

| <i>on-res</i> [kHz] | SP13 [dB] | H-1 | H-2 | H-4/ H-9 | H-5 | H-6 | H-8 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|------------------------|--------------|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| -0.7 | 25 | 2.6 | 4.1 | 5.6 | 5.9 | 4.5 | 5.1 | 5.8 | 7.6 | 7.2 | 7.2 | 6.0 |
| -0.7 | 35 | 0.3 | 1.2 | 1.2 | 1.6 | 4.0 | 2.2 | 2.1 | 1.8 | 2.3 | 2.7 | 1.9 |

Die Intensität von Artefaktensignalen wurde in Abhängigkeit von der Magnesiumkonzentration im Messpuffer bestimmt. Für die Experimente wurden vier 154.8 μM FDP-Proben vorbereitet. Jeweils 2, 4, 10 und 20 μL einer 10 mM MgCl_2 -Lösung in *d*TBS wurden auf 200 μL mit *d*TBS aufgefüllt. Anschließend wurde jeder Probe 13.2 μL einer 2.5 μM FDP-Lösung in *d*TBS zugefügt. Die Messung erfolgte im 3 mm Matchröhrchen bei 285 K und einem O1 von 3286 Hz. Die verwendeten Pulsprogramme und Aufnahmeparameter sind in der Tabelle 65 zusammengefasst, die Ergebnisse der Messungen in Tabelle 66.

Tabelle 65: Pulsprogramme und Aufnahmeparameter für Artefaktmessungen an verschiedenen 154.8 μM Farnesyldiphosphat-Lösungen (700 MHz, 285 K, *d*TBS, pH 7.8, variierende MgCl_2 -Konzentrationen).

| Experiment | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | Programmspezifische Parameter |
|--------------|-------------------------|-------|------------------------|--|
| ^1H | <i>zgesgp</i> | 256/4 | 10 | SP1: 33.4 dB |
| STD | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 256/4 | 16 | SP1: 34 dB SP13: 35 dB D20: 2 s <i>on-res</i> : 5.25 kHz <i>off-res</i> : 40 kHz PL10/29: 120 dB D29: 0 ms L4: 1 TD(F1): 2 |

Tabelle 66: STD-Experimente zur Bestimmung von Artefakt-Intensitäten an verschiedenen 154.8 μM Farnesyldiphosphat-Lösungen (variierte MgCl_2 -Konzentrationen). Die Angaben sind in Prozent. Zuordnung der Signale: Abbildung 26, S. 51.

| $c(\text{MgCl}_2)$ [mM] | $c(\text{FDP})$ [μM] | H-1 | H-2 | H-4/ H-9 | H-5 | H-6 | H-8 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|----------------------------|--------------------------------------|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| 0.1 | 154.8 | – | – | – | – | – | – | – | 0.3 | 0.5 | 1.2 | 0.2 |
| 0.2 | 154.8 | – | – | – | – | – | – | – | 0.8 | 0.5 | 0.7 | 0.3 |
| 0.5 | 154.8 | 0.3 | – | 1.0 | 0.9 | – | 0.9 | – | 1.0 | 1.2 | 1.8 | 1.1 |
| 1.0 | 154.8 | 0.9 | – | 0.9 | 1.5 | – | 1.0 | – | 1.7 | 2.2 | 2.2 | 1.8 |

8.10.4 Artefaktmessungen an Farnesylmonophosphat

Tabelle 67: Pulsprogramme und Aufnahmeparameter für Artefaktmessungen an einer Farnesylmonophosphat-Lösung (700 MHz, 285 K, $d\text{TBS}$, variierte MgCl_2 -Konzentrationen, pH 7.8).

| Experiment | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | Programmspezifische Parameter |
|-------------------|-------------------------|--------|------------------------|--|
| ^1H | <i>zgesgp</i> | 128/4 | 10 | SP1: 33.4 dB |
| STD ¹⁾ | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 512/4 | 10 | SP1: 34 dB SP13: 45 dB D20: 3 s <i>on-res</i> : 5.25 kHz <i>off-res</i> : 40 kHz PL10/29: 120 dB D29: 0 ms L4: 1 TD(F1): 2 |
| STD ²⁾ | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 1536/4 | 16 | SP1: 34 dB SP13: 35 dB D20: 2 s <i>on-res</i> : 5.25 kHz <i>off-res</i> : 40 kHz PL10/29: 120 dB D29: 0 ms L4: 1 TD(F1): 2 |

Für die Bestimmung der Intensitäten von Artefaktensignalen in den STD-Spektren von FMP wurde eine 10 mM MgCl₂-Lösung in *d*TBS hergestellt (200 µL). Zu der Lösung wurden 2.5, 2.5 und 5 µL einer 10 mM FMP-Lösung titriert und jeweils zwei ¹H-NMR-Spektren und ein STD-NMR-Spektrum aufgezeichnet. Die Messung erfolgte im 3 mm Matchröhrchen bei 285 K und einem O1 von 3286 Hz. Einer zweiten Probe mit 10 mM MgCl₂ in *d*TBS wurden 2.2, 2.2, 4.4 und 4.4 µL einer 2.5 mM und 3.3 µL einer 10 mM FMP-Lösung in *d*TBS zugefügt. Die Messung wurde unter identischen Bedingungen aber mit 1 mM MgCl₂ in *d*TBS wiederholt. Nach jeder Zugabe erfolgte wieder die Akquisition von zwei ¹H-NMR-Spektren und einem STD-NMR-Spektrum. Die zweite und dritte Messreihe wurden ebenfalls im 3 mm Matchröhrchen bei 285 K und einem O1 von 3286 Hz durchgeführt (Tabelle 67-70).

Tabelle 68: STD-Titration von Farnesylmonophosphat zur Bestimmung von Artefakt-Intensitäten (*d*TBS, 10 mM MgCl₂). Die Angaben sind in Prozent. Zuordnung der Signale: Abbildung 25, S.50.

| <i>c</i> (FMP) [µM] | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| 123.5 | 0.8 | 2.7 | 1.4 | 0.8 | 3.1 | 1.8 | 1.3 | 2.0 | 1.7 | 1.3 | 1.9 | 1.4 |
| 243.9 | 2.1 | 3.5 | 2.2 | 1.4 | 3.4 | 2.1 | 1.7 | 2.8 | 3.1 | 2.8 | 3.5 | 2.6 |
| 476.2 | 4.4 | 7.9 | 3.9 | 3.4 | 6.5 | 4.1 | 4.0 | 6.5 | 5.9 | 6.0 | 7.2 | 5.3 |

Tabelle 69: STD-Titration von Farnesylmonophosphat zur Bestimmung von Artefakt-Intensitäten (*d*TBS, 10 mM MgCl₂). Die Angaben sind in Prozent. Zuordnung der Signale: Abbildung 25, S.50.

| <i>c</i> (FMP) [µM] | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| 27.2 | 0.9 | 5.3 | 1.5 | 1.0 | 7.2 | 2.6 | 1.7 | 18.5 | 2.6 | 3.2 | 4.8 | 3.3 |
| 53.8 | 1.7 | 1.2 | 2 | 1.9 | 3.0 | 1.7 | 1.7 | -0.2 | 2.2 | 3.1 | 4.0 | 2.0 |
| 105.4 | 2.1 | 2.2 | 1.7 | 1.7 | 5.5 | 1.3 | 1.6 | 7.1 | 2.2 | 2.6 | 3.9 | 1.9 |
| 154.8 | 1.7 | 1.5 | 1.3 | 0.9 | 2.6 | 1.7 | 1.6 | 0.7 | 2.2 | 2.8 | 3.4 | 1.8 |
| 304.8 | 2.7 | 5.3 | 2.3 | 1.3 | 5.5 | 3.3 | 3.1 | 5.3 | 3.0 | 5.5 | 6.9 | 3.4 |

Tabelle 70: STD-Titration von Farnesylmonophosphat zur Bestimmung von Artefakt-Intensitäten (*d*TBS, 1 mM MgCl₂). Die Angaben sind in Prozent. Zuordnung der Signale: Abbildung 25, S.50.

| <i>c</i> (FMP) [μM] | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| 27.2 | 0.8 | 3.5 | 1.3 | 0.8 | 4.2 | 1.1 | 1.6 | 7.1 | 1.8 | 2.0 | 2.8 | 1.4 |
| 53.8 | 1.4 | 3.6 | 1.3 | 1.1 | 2.7 | 0.9 | 1.2 | 5.2 | 0.9 | 2.6 | 2.2 | 1.9 |
| 105.4 | 0.9 | 2.1 | 0.8 | 0.8 | 1.0 | 1.5 | 1.5 | -3.1 | 2.0 | 2.6 | 2.5 | 1.6 |
| 154.8 | 0.7 | 3.6 | 1.6 | 0.9 | 1.4 | 1.4 | 1.7 | 6.0 | 2.0 | 2.4 | 3.1 | 2.0 |
| 304.8 | 1.1 | 1.3 | 1.4 | 1.2 | 2.7 | 1.2 | 1.3 | 4.4 | 2.0 | 2.2 | 2.7 | 1.8 |

8.10.5 (+)-Germacren D Synthase mit Farnesylmonophosphat

1. Titrationsreihe

Die (+)-GDS wurde entsprechend den Vorschriften 8.3.1 und 8.3.2 exprimiert und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Im Anschluss an die Expression und Reinigung wurde das Enzym in *d*TBS umgepuffert. Die in deuterierten Puffer gewonnene Lösung (0.6 mL, 0.37 mg/mL) wurde so verdünnt, dass eine 2.5 μM (+)-GDS-Lösung (200 μL, 0.17 mg/mL) erhalten wurde. Der Anteil an MgCl₂ in dem Puffer betrug 10 mM. Die Lösung wurde in ein 3 mm Match-Röhrchen gefüllt und 2.2, 2.2, 4.4 und 4.4 μL einer 2.5 mM und 3.3 μL einer 10 mM FMP-Lösung in *d*TBS zugefügt. Nach jeder Zugabe wurde ein STD-Spektrum aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte in der beschriebenen Weise. Von den STD-Signalen wurden die Artefaktssignale bei entsprechender Konzentration abgezogen und nach Gleichung 2 (S. 23) die Amplifikationsfaktoren berechnet. Die Amplifikationsfaktoren wurden dann gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen und nach der Gleichung 3 (S. 24) gefittet. In den Tabellen 71-76 sind die Aufnahmeparameter sowie die Messergebnisse zusammengefasst. Die Tabelle 77 enthält die STD-Amplifikationsfaktoren, die sich aus den Tabellen 71-75 ergeben. Die Zuordnung der Signale ist in Abbildung 25 (S.50) dargestellt.

Tabelle 71: Pulsprogramme und Aufnahmeparameter für STD-Titrationsen von Farnesylmonophosphat zu einer 2.5 μM (+)-GDS-Lösung (700 MHz, 285 K, *d*TBS, variierende MgCl_2 -Konzentrationen, pH 7.8).

| Experiment | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | Programmspezifische Parameter |
|------------|-------------------------|--------|------------------------|--|
| STD | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 1536/4 | 16 | SP1: 34 dB SP13: 35 dB D20: 2 s <i>on-res</i> : 5.25 kHz <i>off-res</i> : 40 kHz PL10/29: 10 dB D29: 15 ms L4: 1 TD(F1): 2 |

Tabelle 72: 1. Titrationspunkt: 27.2 μM Farnesylmonophosphat und 2.5 μM (+)-Germacren D Synthase (*d*TBS, 10 mM MgCl_2). Die Angaben sind in Prozent.

| | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|-----------------------------|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|------|------|------|------|
| <i>STD</i> | 7.4 | 12.1 | 7.7 | 6.9 | 17.9 | 9.4 | 7.1 | 13.2 | 9.5 | 10.4 | 12.3 | 9.2 |
| <i>STD_{Artef.}</i> | 0.2 | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.3 | 0.4 | 0.5 | 0.3 |
| <i>STD_{korr.}</i> | 7.2 | 11.7 | 7.5 | 6.7 | 17.5 | 9.2 | 6.9 | 12.8 | 9.2 | 10.0 | 11.8 | 8.9 |

Tabelle 73: 2. Titrationspunkt: 53.8 μM Farnesylmonophosphat und 2.5 μM (+)-Germacren D Synthase (*d*TBS, 10 mM MgCl_2). Die Angaben sind in Prozent.

| | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|------|------|------|------|
| <i>STD</i> | 7.1 | 9.9 | 6.2 | 4.3 | 11.5 | 6.8 | 7.3 | 14.9 | 9.9 | 10.3 | 12.8 | 9.5 |
| <i>STD_{Artef.}</i> | 0.5 | 0.9 | 0.4 | 0.3 | 0.8 | 0.5 | 0.5 | 0.7 | 0.6 | 0.7 | 0.9 | 0.6 |
| <i>STD_{korr.}</i> | 6.6 | 9.0 | 5.8 | 4.0 | 10.7 | 6.3 | 6.8 | 14.2 | 9.3 | 9.6 | 11.9 | 8.9 |

Tabelle 74: 3. Titrationspunkt: 105.4 μM Farnesylmonophosphat und 2.5 μM (+)-Germacren D Synthase (*d*TBS, 10 mM MgCl_2). Die Angaben sind in Prozent.

| | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|------|------|------|------|------|
| <i>STD</i> | 7.3 | 9.7 | 6.4 | 4.9 | 10.4 | 6.7 | 5.6 | 12.1 | 9.3 | 10.3 | 11.9 | 9.1 |
| <i>STD_{Artef.}</i> | 1.0 | 1.7 | 0.9 | 0.7 | 1.6 | 1.0 | 0.9 | 1.4 | 1.3 | 1.5 | 1.8 | 1.2 |
| <i>STD_{korr.}</i> | 6.3 | 8.0 | 5.5 | 4.2 | 8.8 | 5.7 | 4.7 | 10.7 | 8.0 | 8.8 | 10.1 | 7.9 |

Tabelle 75: 4. Titrationspunkt: 154.8 μM Farnesylmonophosphat und 2.5 μM (+)-Germacren D Synthase (*d*TBS, 10 mM MgCl_2). Die Angaben sind in Prozent.

| | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>STD</i> | 13.1 | 16.6 | 11.8 | 11.1 | 18.5 | 12.7 | 11.7 | 21.9 | 17.1 | 18.0 | 20.9 | 16.1 |
| <i>STD</i> _{Artef.} | 1.4 | 2.5 | 1.3 | 1.0 | 2.4 | 1.5 | 1.4 | 2.1 | 1.9 | 2.2 | 2.6 | 1.7 |
| <i>STD</i> _{korr.} | 11.7 | 14.1 | 10.5 | 10.1 | 16.1 | 11.2 | 10.3 | 19.8 | 15.2 | 15.8 | 18.3 | 14.4 |

Tabelle 76: 5. Titrationspunkt: 304.8 μM Farnesylmonophosphat und 2.5 μM (+)-Germacren D Synthase (*d*TBS, 10 mM MgCl_2). Die Angaben sind in Prozent.

| | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <i>STD</i> | 18.9 | 23.7 | 16.9 | 15.6 | 23.4 | 17.9 | 17.6 | 29.0 | 23.2 | 24.8 | 28.3 | 22.0 |
| <i>STD</i> _{Artef.} | 2.8 | 5.0 | 2.5 | 1.9 | 4.7 | 2.9 | 2.7 | 4.2 | 3.7 | 4.2 | 5.2 | 3.4 |
| <i>STD</i> _{korr.} | 16.1 | 18.7 | 14.4 | 13.7 | 18.7 | 15.0 | 14.9 | 24.8 | 19.5 | 20.6 | 23.1 | 18.6 |

Tabelle 77: STD-Amplifikationsfaktoren der 1. Titrationsreihen nach Gleichung 2 und Bestimmung der Dissoziationskonstanten nach Gleichung 3, vgl. S. 23-24.

| <i>c</i> (FMP) [μM] | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|--|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 27.2 | 0.8 | 1.3 | 0.8 | 0.7 | 1.9 | 1.0 | 0.8 | 1.4 | 1.0 | 1.1 | 1.3 | 1.0 |
| 53.8 | 1.5 | 2.0 | 1.3 | 0.9 | 2.3 | 1.4 | 1.5 | 3.1 | 2.0 | 2.1 | 2.6 | 2.0 |
| 105.4 | 2.8 | 3.5 | 2.4 | 1.9 | 3.9 | 2.5 | 2.0 | 4.7 | 3.5 | 3.9 | 4.5 | 3.5 |
| 154.8 | 7.7 | 9.3 | 6.9 | 6.7 | 10.7 | 7.4 | 6.8 | 13.0 | 10.0 | 10.5 | 12.0 | 9.5 |
| 304.8 | 21.3 | 24.7 | 19.0 | 18.1 | 24.7 | 19.8 | 19.7 | 32.8 | 25.8 | 27.2 | 30.5 | 24.5 |
| <i>K_D</i> [μM] | 841 | 217 | 391 | 610 | 93 | 188 | 108 | 215 | 482 | 853 | 433 | 483 |

2. Titrationsreihe

Für die zweite Messreihe wurde die (+)-GDS aus demselben Expressionsansatz wie für die vorhergehende Messung verwendet. Es wurde wieder eine 2.5 μM Enzym-Lösung (200 μL , 0.17 mg/mL) hergestellt, der Anteil an MgCl_2 in dem Puffer betrug in diesem Fall 1 mM. Die Lösung wurde in ein 3 mm Match-Röhrchen gefüllt und 2.2, 2.2, 4.4 und 4.4 μL einer 2.5 mM und 3.3 μL einer 10 mM FMP-Lösung in *d*TBS zugefügt. Nach jeder Zugabe wurde ein STD-Spektrum aufgenommen. Die Auswertung der Spektren erfolgte in der beschriebenen Weise. Von den STD-Signalen wurden die Artefaktensignale bei entsprechender

Konzentration abgezogen und nach Gleichung 2 die Amplifikationsfaktoren berechnet. Die Amplifikationsfaktoren wurden dann gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen und nach der Gleichung 3 gefittet. Die Aufnahmeparameter der STD-Spektren waren identisch zu der 1. Messreihe. Die Ergebnisse der STD-Messung sind in den Tabellen 78-82 zusammengefasst, die entsprechenden STD-Amplifikationsfaktoren enthält Tabelle 83. Die Zuordnung der Signale ist in Abbildung 25 (S.50) dargestellt.

Tabelle 78: 1. Titrationspunkt: 27.2 μM Farnesylmonophosphat und 2.5 μM (+)-Germacren D Synthase ($d\text{TBS}$, 1 mM MgCl_2). Die Angaben sind in Prozent.

| | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|-----------------------------|-----|------|-----|-----|------|-----|-----|------|------|------|------|------|
| <i>STD</i> | 6.6 | 10.3 | 6.8 | 5.7 | 10.1 | 7.3 | 6.7 | 10.6 | 9.1 | 9.4 | 11.9 | 8.9 |
| <i>STD_{Artef.}</i> | 0.1 | 0.2 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.1 | 0.2 | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 0.3 | 0.2 |
| <i>STD_{korr.}</i> | 6.5 | 10.1 | 6.6 | 5.6 | 9.8 | 7.2 | 6.6 | 10.2 | 8.9 | 9.2 | 11.6 | 8.7 |

Tabelle 79: 2. Titrationspunkt: 53.8 μM Farnesylmonophosphat und 2.5 μM (+)-Germacren D Synthase ($d\text{TBS}$, 1 mM MgCl_2). Die Angaben sind in Prozent.

| | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|-----------------------------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| <i>STD</i> | 6.3 | 10.2 | 5.7 | 5.1 | 9.0 | 6.2 | 6.1 | 14.9 | 9.4 | 9.5 | 11.5 | 9.0 |
| <i>STD_{Artef.}</i> | 0.2 | 0.4 | 0.3 | 0.2 | 0.5 | 0.3 | 0.3 | 0.8 | 0.4 | 0.5 | 0.6 | 0.4 |
| <i>STD_{korr.}</i> | 6.1 | 9.7 | 5.4 | 4.8 | 8.5 | 6.0 | 5.8 | 14.1 | 8.9 | 9.0 | 10.9 | 8.6 |

Tabelle 80: 3. Titrationspunkt: 105.4 μM Farnesylmonophosphat und 2.5 μM (+)-Germacren D Synthase ($d\text{TBS}$, 1 mM MgCl_2). Die Angaben sind in Prozent.

| | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|-----------------------------|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| <i>STD</i> | 6.3 | 10.4 | 6.1 | 5.3 | 9.2 | 6.9 | 6.3 | 15.8 | 9.2 | 9.6 | 11.4 | 8.7 |
| <i>STD_{Artef.}</i> | 0.4 | 0.9 | 0.6 | 0.5 | 0.9 | 0.5 | 0.6 | 1.5 | 0.8 | 0.9 | 1.2 | 0.8 |
| <i>STD_{korr.}</i> | 5.9 | 9.6 | 5.5 | 4.8 | 8.3 | 6.4 | 5.7 | 14.3 | 8.3 | 8.7 | 10.2 | 7.9 |

Tabelle 81: 4. Titrationspunkt: 154.8 μM Farnesylmonophosphat und 2.5 μM (+)-Germacren D Synthase ($d\text{TBS}$, 1 mM MgCl_2). Die Angaben sind in Prozent.

| | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| <i>STD</i> | 6.8 | 9.3 | 5.7 | 5.1 | 9.7 | 6.1 | 5.7 | 13.5 | 9.1 | 9.6 | 11.7 | 8.5 |
| <i>STD_{Artef.}</i> | 0.6 | 1.3 | 0.9 | 0.7 | 1.4 | 0.8 | 0.9 | 2.2 | 1.2 | 1.4 | 1.7 | 1.1 |
| <i>STD_{korr.}</i> | 6.2 | 8.0 | 4.8 | 4.4 | 8.3 | 5.4 | 4.8 | 11.3 | 7.9 | 8.3 | 10.0 | 7.4 |

Tabelle 82: 5. Titrationspunkt: 304.8 μM Farnesylmonophosphat und 2.5 μM (+)-Germacren D Synthase ($d\text{TBS}$, 1 mM MgCl_2). Die Angaben sind in Prozent.

| | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|-----------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|
| <i>STD</i> | 6.7 | 9.8 | 5.8 | 5.3 | 9.9 | 6.0 | 5.9 | 13.2 | 8.9 | 9.3 | 11.4 | 8.5 |
| <i>STD_{Artef.}</i> | 1.2 | 2.5 | 1.8 | 1.3 | 2.7 | 1.5 | 1.7 | 4.4 | 2.4 | 2.7 | 3.4 | 2.2 |
| <i>STD_{korr.}</i> | 5.5 | 7.3 | 4.0 | 4.0 | 7.2 | 4.5 | 4.2 | 8.8 | 6.5 | 6.6 | 8.0 | 6.2 |

Tabelle 83: STD-Amplifikationsfaktoren der 2. Titrationsreihen nach Gleichung 2 und Bestimmung der Dissoziationskonstanten nach Gleichung 3, vgl. S. 23-24.

| FMP Übersch. | H-1 | H-2 | H-4 | H-5 | H-6 | H-8 | H-9 | H-10 | H-12 | H-13 | H-14 | H-15 |
|-------------------------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|-------|------|
| 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 27.2 | 0.72 | 1.11 | 0.73 | 0.62 | 1.08 | 0.79 | 0.72 | 1.12 | 0.98 | 1.01 | 1.27 | 0.96 |
| 53.8 | 1.34 | 2.14 | 1.18 | 1.07 | 1.87 | 1.31 | 1.28 | 3.10 | 1.97 | 1.99 | 2.39 | 1.90 |
| 105.4 | 2.62 | 4.21 | 2.42 | 2.11 | 3.63 | 2.82 | 2.50 | 6.29 | 3.67 | 3.82 | 4.51 | 3.48 |
| 154.8 | 4.09 | 5.30 | 3.15 | 2.93 | 5.49 | 3.53 | 3.17 | 7.43 | 5.23 | 5.45 | 6.60 | 4.87 |
| 304.8 | 7.26 | 9.60 | 5.31 | 5.32 | 9.50 | 5.89 | 5.54 | 11.63 | 8.61 | 8.67 | 10.60 | 8.22 |
| K_D [μM] | 2282 | 772 | 640 | 1403 | 1347 | 567 | 698 | 227 | 726 | 619 | 686 | 772 |

8.10.6 (+)-Germacren D Synthase mit Farnesyldiphosphat

1. Experiment

Tabelle 84: Pulsprogramme und Aufnahmeparameter für das 1. STD-Kinetikexperiment von 500 μM Farnesyldiphosphat mit 2.5 μM (+)-Germacren D Synthase (700 MHz, 285 K, $d\text{TBS}/\text{DMSO-}d_6$ 95:5, 1 mM MgCl_2 , pH 7.8).

| Experiment | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | Programmspezifische Parameter |
|------------|-------------------------|-------|------------------------|--|
| STD | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 128/4 | 16 | SP1: 34 dB SP13: 45 dB D20: 3 s <i>on-res</i> : 5.25 kHz <i>off-res</i> : 40 kHz PL10/29: 10 dB D29: 15 ms L4: 32 TD(F1): 64 |

Die (+)-GDS wurde entsprechend den Vorschriften 8.3.1 und 8.3.2 exprimiert und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Im Anschluss an die Expression und Reinigung wurde das Enzym in $d\text{TBS}$ umgepuffert. Die erhaltene Lösung (0.2 mL, 3.7 mg/mL) wurde verdünnt, so dass eine 2.5 μM (+)-GDS-Lösung in $d\text{TBS}$ (190 μL , 0.16 mg/mL) erhalten wurde. Der Anteil an MgCl_2 in dem Puffer betrug 1 mM. Die Lösung wurde in ein 3 mm Match-Röhrchen gefüllt und 10 μL $\text{DMSO-}d_6$ zugefügt. Die Probe wurde *gewobbelt* und *geschimt* und ein STD-NMR-Spektrum vorbereitet. Anschließend wurde die Probe aus dem Spektrometer entfernt und 10 μL einer 10 mM FDP-Lösung in $d\text{TBS}$ zugefügt. Nachdem die Probe dem Spektrometer wieder zugefügt wurde, wurde das Experiment umgehend gestartet. Die Temperatur während der Messung betrug 285 K, der O1 wurde auf 3286 Hz gesetzt. Die Gesamtzeit des Experiments betrug 11 h 41 min 20 s. Die Zeit für ein Subspektrum betrug 21 min 55 s (Summe aus *on-* und *off-resonance* Spektrum). Die Tabellen 84 und 85 fassen die Aufnahmeparameter und die Ergebnisse aus dem Experiment zusammen.

Tabelle 85: Integrale (Int.) der Signale H-2 von FDP und H-5 von (+)-GD. Berechnung der Korrektur für die Signale von H-2. Der fett markierte Wert dient als Referenz für die Korrektur der FDP-Integrale.

| Zeit [min] | Int. $\times 10^8$ H-2 FDP aus Spekt. | Int. $\times 10^8$ H-5 GD aus Spekt. | Summer der Int. $\times 10^8$ GD und FDP | Differenz zum höchsten Int. $\times 10^8$ (fett) | Korrigiertes Int. $\times 10^8$ H-2 FDP | c(FDP) [μM] | c(GD) [μM] |
|---------------|---|--|--|---|---|-----------------------------|----------------------------|
| 11 | 2.33 | 0.25 | 2.58 | 2.49 | 4.83 | 476 | 24 |
| 33 | 1.74 | 1.04 | 2.78 | 2.29 | 4.03 | 397 | 103 |
| 55 | 1.57 | 1.81 | 3.38 | 1.70 | 3.27 | 322 | 178 |
| 77 | 1.36 | 2.45 | 3.81 | 1.27 | 2.62 | 259 | 241 |
| 99 | 1.27 | 2.95 | 4.22 | 0.85 | 2.12 | 209 | 291 |
| 121 | 1.16 | 3.39 | 4.55 | 0.53 | 1.68 | 166 | 334 |
| 143 | 1.01 | 3.69 | 4.70 | 0.37 | 1.38 | 136 | 364 |
| 165 | 8.64 | 3.98 | 4.85 | 0.23 | 1.09 | 107 | 393 |
| 187 | 0.76 | 4.23 | 4.99 | 0.79 | 0.84 | 83 | 417 |
| 209 | 0.70 | 4.37 | 5.07 | – | 0.70 | 69 | 431 |
| 231 | 0.56 | 4.44 | 5.00 | – | 0.56 | 55 | 438 |
| 253 | 0.50 | 4.57 | 5.06 | – | 0.50 | 49 | 450 |
| 275 | 0.42 | 4.56 | 4.98 | – | 0.42 | 42 | 449 |
| 297 | 0.34 | 4.60 | 4.93 | – | 0.34 | 33 | 453 |
| 319 | 0.32 | 4.63 | 4.95 | – | 0.32 | 31 | 457 |
| 341 | 0.29 | 4.65 | 4.93 | – | 0.29 | 28 | 458 |
| 363 | 0.28 | 4.65 | 4.92 | – | 0.28 | 27 | 458 |
| 385 | 0.24 | 4.68 | 4.91 | – | 0.24 | 23 | 461 |

2. Experiment

Die (+)-GDS wurde entsprechend den Vorschriften 8.3.1 und 8.3.2 exprimiert und mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Im Anschluss an die Expression und Reinigung wurde das Enzym in *d*TBS umgepuffert. Die in deuterierten Puffer gewonnene Lösung (0.5 mL, 0.41 mg/mL) wurde so verdünnt, dass vier 1.25 μM (+)-GDS-Lösungen in *d*TBS (200 μL , 0.08 mg/mL) erhalten wurden. Der Anteil an MgCl_2 in den einzelnen Enzymproben betrug 0.1, 0.2, 0.5 und 1 mM. Jede Lösung wurde in ein 3 mm Match-Röhrchen gefüllt und direkt vor Beginn des jeweiligen Experiments am 700 MHz

Spektrometer *gewobbelt* und *geshimit*. Nach Einstellung der Aufnahmeparameter wurde die zu vermessende Probe aus dem Spektrometer entfernt. Für jedes Experiment wurden der Probe 13.2 μL einer 2.5 mM FDP-Lösung in *d*TBS zugefügt. Direkt im Anschluss an die Zugabe wurde die Probe dem Spektrometer wieder zugeführt und das Experiment gestartet. Für die Enzymproben mit der 1 mM, 0.5 mM und 0.2 mM MgCl_2 -Konzentration betrug die Gesamtzeit des Experiments 3 h 2 min 37 s, jedes Subspektrum dauerte 15 min 10 s. Für die Enzymlösung mit der 0.1 mM MgCl_2 -Konzentration wurde die Anzahl der *scans* pro Inkrement und die Anzahl der Inkremente erhöht, so dass eine Gesamtzeit von 8 h 6 min 11 s resultierte sowie 30 min 21 s für jedes Subspektrum. Die Temperatur während der Messung betrug 285 K, der O1 wurde auf 3286 Hz gesetzt. Die Aufnahmeparameter und die Ergebnisse aus dem Experiment sind in den Tabellen 86-88 zusammengefasst.

Tabelle 86: Pulsprogramme und Aufnahmeparameter für das 2. STD-Kinetikexperiment von 154.8 μM Farnesyldiphosphat mit 1.25 μM (+)-Germacren D Synthase (700 MHz, 285 K, *d*TBS/DMSO-*d*₆ 95:5, variierende Konzentrationen MgCl_2 , pH 7.8).

| Experiment | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | Programmspezifische Parameter |
|-------------------|-------------------------|-------|------------------------|--|
| STD ¹⁾ | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 128/4 | 16 | SP1: 34 dB SP13: 35 dB D20: 2 s <i>on-res</i> : 5.25 kHz <i>off-res</i> : 40 kHz PL10/29: 10 dB D29: 15 ms L4: 12 TD(F1): 24 |
| STD ²⁾ | <i>stddiffesgp2d.th</i> | 256/4 | 16 | SP1: 34 dB SP13: 35 dB D20: 2 s <i>on-res</i> : 5.25 kHz <i>off-res</i> : 40 kHz PL10/29: 10 dB D29: 15 ms L4: 16 TD(F1): 32 |

Tabelle 87: Zeit-Verlauf der Integrale (Int.) der H-12 Methylprotonen von FDP für das 2. STD-Kinetikexperiment zwischen der (+)-GDS (1.25 μM) und FDP (154.8 μM) in $d\text{TBS}$ mit variierenden MgCl_2 -Konzentrationen.

| Zeit [min] | Int. $\times 10^8$ 1 mM Mg | Int. $\times 10^8$ 0.5 mM Mg | Int. $\times 10^8$ 0.2 mM Mg | Int. $\times 10^8$ 0.1 mM Mg |
|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <i>Extrapoliert auf 0</i> | 21.1 | 23.1 | 23.3 | 23.3 |
| 7.5 | 19.0 | 20.9 | 21.9 | – |
| 15.0 | – | – | – | 22.1 |
| 22.5 | 16.2 | 19.1 | 21.8 | – |
| 37.5 | 13.2 | 16.6 | 21.1 | – |
| 45.0 | – | – | – | 21.7 |
| 52.5 | 10.7 | 14.5 | 20.2 | – |
| 67.5 | 8.75 | 12.6 | 19.3 | – |
| 75.0 | – | – | – | 20.6 |
| 82.5 | 7.24 | 10.7 | 18.5 | – |
| 97.5 | 5.81 | 9.41 | 17.9 | – |
| 105.0 | – | – | – | 19.6 |
| 112.5 | 4.82 | 7.87 | 17.2 | – |
| 127.5 | 4.04 | 6.89 | 16.4 | – |
| 135.0 | – | – | – | 18.9 |
| 142.5 | 3.47 | 6.00 | 15.9 | – |
| 157.5 | 3.01 | 5.22 | 15.1 | – |
| 165.0 | – | – | – | 17.9 |
| 172.5 | 2.69 | 4.49 | 14.6 | – |
| 195.0 | – | – | – | 17.1 |
| 225.0 | – | – | – | 16.3 |
| 255.0 | – | – | – | 15.8 |
| 285.0 | – | – | – | 15.1 |
| 315.0 | – | – | – | 14.4 |
| 345.0 | – | – | – | 13.9 |
| 375.0 | – | – | – | 13.4 |
| 405.0 | – | – | – | 12.8 |
| 435.0 | – | – | – | 12.3 |
| 465.0 | – | – | – | 11.9 |

Tabelle 88: Konzentrations-Zeit-Verlauf für das 2. STD-Kinetikexperiment zwischen der (+)-GDS (1.25 μM) und FDP (154.8 μM) in *d*TBS. Die jeweiligen Konzentrationen wurden entsprechend der Abbildung 65 (S. 102) korrigiert.

| Zeit [min] | $c(\text{FDP})$ [μM] 1 mM Mg | $c(\text{FDP})$ [μM] 0.5 mM Mg | $c(\text{FDP})$ [μM] 0.2 mM Mg | $c(\text{FDP})$ [μM] 0.1 mM Mg |
|---------------|--|--|--|--|
| 7.5 | 134.4 | 137.7 | 144.5 | – |
| 15.0 | – | – | – | 145.6 |
| 22.5 | 108.0 | 123.0 | 144.0 | – |
| 37.5 | 80.1 | 104.0 | 138.1 | – |
| 45.0 | – | – | – | 142.9 |
| 52.5 | 60.0 | 87.6 | 131.1 | – |
| 67.5 | 48.9 | 72.9 | 124.6 | – |
| 75.0 | – | – | – | 134.3 |
| 82.5 | 40.5 | 59.9 | 118.0 | – |
| 97.5 | 32.5 | 52.6 | 113.2 | – |
| 105.0 | – | – | – | 126.5 |
| 112.5 | 27.0 | 44.0 | 108.0 | – |
| 127.5 | 22.6 | 38.5 | 101.9 | – |
| 135.0 | – | – | – | 120.9 |
| 142.5 | 19.4 | 33.5 | 98.0 | – |
| 157.5 | 16.8 | 29.2 | 92.2 | – |
| 165.0 | – | – | – | 113.2 |
| 172.5 | 15.0 | 25.1 | 87.8 | – |
| 195.0 | – | – | – | 107.2 |
| 225.0 | – | – | – | 101.4 |
| 255.0 | – | – | – | 96.8 |
| 285.0 | – | – | – | 91.6 |
| 315.0 | – | – | – | 86.7 |
| 345.0 | – | – | – | 82.6 |
| 375.0 | – | – | – | 78.6 |
| 405.0 | – | – | – | 74.1 |
| 435.0 | – | – | – | 70.5 |
| 465.0 | – | – | – | 67.2 |

8.10.7 Farnesyltransferase

25 μ L einer käuflich erworbenen FTase-Lösung (1 mg/mL in 100 mM HEPES-Puffer) wurde mittels Dialyse in *d*TBS umgepuffert. In einem ersten Versuch wurde ein Puffer mit der bereits beschriebenen Zusammensetzung verwendet (50 mM Tris-HCl-*d*₁₁, 300 mM NaCl, 20 mM NaN₃), in einem zweiten Versuch wurde die Pufferzusammensetzung etwas variiert (25 mM Tris-HCl-*d*₁₁, 100 mM NaCl, 20 mM NaN₃, 20 μ M ZnCl₂, 1 mM DTT-*d*₉, pH 7.5). Die Ausbeute für die Dialyse betrug in beiden Fällen ca. 80%. Es wurden verschiedene Titrations- und Kinetik-Experimente durchgeführt, wobei das Pulsprogramm *stddiffesgp2d.th* eingesetzt wurde. Die Spektren wurden entsprechend den Experimenten der (+)-Germacren D Synthese mit den Farnesylphosphaten FMP und FDP angesetzt. Einige der Aufnahmeparameter sind in Tabelle 90 aufgelistet. Da in keinem der Experimente ein Reaktionsumsatz zu beobachten war, erfolgte keine Auswertung der Daten.

Tabelle 89: Pulsprogramm und Aufnahmeparameter für die STD-Experimente mit der Farnesyltransferase (700 MHz, *d*TBS, 1 mM MgCl₂, pH 7.8).

| Experiment | Pulsprogramm | NS/DS | SW [ppm] (F2/F1) | Programmspezifische Parameter |
|------------|-------------------------|----------|------------------------|--|
| STD | <i>stddiffesgp2d.th</i> | variabel | 16 | SP1: 34 dB SP13: 35 dB D20: 2 s <i>on-res</i> : -0.7 kHz <i>off-res</i> : 40 kHz PL10/29: 10 dB D29: 15 ms L4: variabel TD(F1): variabel |

8.11 Molecular Modeling

Das *structural alignment* der (+)-Germacren D Synthese mit der 5-*epi*-Aristioloehensynthase (PDBID: 5EAT) wurde mit Hilfe der Software *DeepView* durchgeführt und als Projekt gespeichert. Die Details des *alignments* stehen auf S. 203. Das *molecular modeling* wurde mit dem SYBYL-Softwarepaket von Tripos durchgeführt. Zunächst wurden die in Tabelle 19 (S. 114) aufgelisteten *loop*-Sequenzen mit Hilfe des *looptools* korrigiert. Anschließend wurden

die bestehenden Atomtypen überprüft, der C-Terminus als Carboxylat- und der N-Terminus als NH_3^+ -Gruppe dargestellt. Ladungen wurden mit Hilfe der Methode, die von Gasteiger und Marsili beschrieben wurde, zugewiesen und die Dielektrizitätskonstante zur Simulation von Wasser auf 15 gesetzt.¹¹⁴ Die Struktur der (+)-Germacren D Synthase wurde in 2500 Iterationsschritten mit den in Tabelle 90 angegebenen Parametern energieminiert. Für die übrigen Parameter wurden die Voreinstellungen übernommen.

Tabelle 90: Parameter der Energieminimierung der Ausgangsstruktur des Homologiemodells der (+)-Germacren D Synthase.

| | |
|--|--------------------------|
| <i>Energy before minimization [kcal/mol]</i> | 84 083 898.583 |
| <i>Energy after minimization [kcal/mol]</i> | -1153.360 |
| <i>Method</i> | <i>Powell</i> |
| <i>Initial Optimization</i> | <i>Simplex</i> |
| <i>Termination (Gradient)</i> | 0.05 kcal/(mol*Å) |
| <i>Max Iteration</i> | 2500 |
| <i>Force Field</i> | Tripos |
| <i>Charges</i> | <i>Gasteiger-Marsili</i> |
| <i>NB Cutoff</i> | 8.0 |
| <i>Dielectric Function</i> | <i>Distance</i> |
| <i>Dielectric Constant</i> | 15.0 |

Anschließend wurden die Struktur FHP900 (Farnesylhydroxyphosphonat) aus der Röntgenstruktur 5EAT zum Farnesyldiphosphat modifiziert. Das modifizierte FHP900, die drei Magnesiumionen (MG851, MG852, MG853) und vier ausgewählte Wasser-Moleküle (HOH679, HOH684, HOH719 und HOH753) wurden in die Ebene der (+)-Germacren D Synthase kopiert. Für die korrekte Behandlung der Magnesiumionen wurden die Parameter des TRIPOS-Kraftfeldes um die angegebenen Bindungsabstände in Angström erweitert (MG-Oco2: 2.35 [*non covalent*], MG-O2: 2.4 [*non covalent*], MG-O3: 2.5 [*non covalent*]). Die Atomtypen wurden überprüft, die Ladungen nach Gasteiger und Marsili zugewiesen und die Struktur erneut in 2500 Iterationsschritten energieminiert (Tabelle 91).

Tabelle 91: Parameter der Energieminimierung des Homologiemodells der (+)-Germacren D Synthese mit Ligand.

| | |
|--|--------------------------|
| <i>Energy before minimization [kcal/mol]</i> | 344 464.255 |
| <i>Energy after minimization [kcal/mol]</i> | -1294.370 |
| <i>Method</i> | <i>Powell</i> |
| <i>Initial Optimization</i> | <i>Simplex</i> |
| <i>Termination (Gradient)</i> | 0.05 kcal/(mol*A) |
| <i>Max Iteration</i> | 2500 |
| <i>Force Field</i> | Tripos |
| <i>Charges</i> | <i>Gasteiger-Marsili</i> |
| <i>NB Cutoff</i> | 8.0 |
| <i>Dielectric Function</i> | <i>Distance</i> |
| <i>Dielectric Constant</i> | 15.0 |

Die Proton-Proton-Abstände, die für die Berechnung der $1/r^6$ -Beziehung berücksichtigt worden sind, finden sich im Anhang ab S. 209.

9 LITERATURVERZEICHNIS

1. Besseling, N. A. M. and Lyklema, J. (1997) Molecular Thermodynamics of Hydrophobic Hydration. *J. Phys. Chem. B* 101, 7604-7611.
2. Blokzijl, W. and Engberts, J. B. F. N. (1993) Hydrophobic Effects. Opinions and Facts. *Angew. Chem. Int. Edit.* 32, 1545-1579.
3. Böhm, H.-J., Klebe, G., and Kubinyi, H. (2002) *Wirkstoffdesign - der Weg zum Arzneimittel*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg; Berlin.
4. Christen, P. and Jaussi, R. (2005) *Biochemie*, 1. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg.
5. Ben-Amotz, D. and Underwood, R. (2008) Unraveling water's entropic mysteries: a unified view of nonpolar, polar, and ionic hydration. *Acc. Chem. Res.* 41, 957-967.
6. Hummer, G. (1999) Hydrophobic Force Field as a Molecular Alternative to Surface-Area Models. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 6299-6305.
7. Charlier, L., Nespoulous, C., Fiorucci, S., Antonczak, S. and Golebiowski, J. (2007) Binding free energy prediction in strongly hydrophobic biomolecular systems. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9, 5761-5771.
8. Wasan, K. M., Brocks, D. R., Lee, S. D., Sachs-Barrable, K. and Thornton, S. J. (2008) Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 7, 84-99.
9. Christianson, D. W. (2006) Structural biology and chemistry of the terpenoid cyclases. *Chem. Rev.* 106, 3412-3442.
10. Liang, P.-H., Ko, Z.-P. and Wang, A. H. J. (2002) Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *FEBS J.* 269, 3339-3354.
11. Bloch, K., Chaykin, S., Phillips, A. H. and De Waard, A. (1959) Mevalonic acid pyrophosphate and isopentenylpyrophosphate. *J. Biol. Chem.* 234, 2595-2604.
12. Lynen, F., Eggerer, H., Henning, U. and Kessel, I. (1958) Biosynthesis of the terpenes. III. Farnesyl pyrophosphate and 3-methyl-3-buten-1-yl pyrophosphate, the biological precursors of squalene. *Angew. Chem.* 70, 738-742.

13. Nuhn, P. (1997) *Naturstoffchemie: Mikrobielle, pflanzliche und tierische Naturstoffe.*, 3. Auflage, Hirzel, Stuttgart.
14. Konstantinopoulos, P. A., Karamouzis, M. V. and Papavassiliou, A. G. (2007) Post-translational modifications and regulation of the RAS superfamily of GTPases as anticancer targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 541-555.
15. Chappell, J. (1995) Biochemistry and Molecular Biology of the Isoprenoid Biosynthetic Pathway in Plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 46, 521-547.
16. Schulze, B., Kost, C., Arimura, G.-I. and Boland, W. (2006) Duftstoffe: Die Sprache der Pflanzen. Signalrezeption, Biosynthese und Ökologie. *Chem. Unserer Zeit* 40, 366-377.
17. Arimura, G.-I., Garms, S., Maffei, M., Bossi, S., Schulze, B., Leitner, M., Mithöfer, A. and Boland, W. (2008) Herbivore-induced terpenoid emission in *Medicago truncatula*: concerted action of jasmonate, ethylene and calcium signaling. *Planta* 227, 453-464.
18. Bouvier, F., Rahier, A. and Camara, B. (2005) Biogenesis, molecular regulation and function of plant isoprenoids. *Prog. Lipid Res.* 44, 357-429.
19. Adam, K.-P. and Zapp, J. (1998) Biosynthesis of the isoprene units of chamomile sesquiterpenes. *Phytochemistry* 48, 953-959.
20. Arigoni, D., Sagner, S., Latzel, C., Eisenreich, W., Bacher, A. and Zenk, M. H. (1997) Terpenoid biosynthesis from 1-deoxy-D-xylulose in higher plants by intramolecular skeletal rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 10600-10605.
21. Dewick, P. M. (2002) The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds. *Nat. Prod. Rep.* 19, 181-222.
22. Cane, D. E. (1999) Sesquiterpene Biosynthesis: Cyclisation Mechanisms. In Barton, D. H. R. and Nakanishi, K., editors. *Comprehensive Natural Products Chemistry*, Elsevier Science, Oxford.
23. Bülow, N. and König, W. A. (2000) The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. *Phytochemistry* 55, 141-168.

24. Rynkiewicz, M. J., Cane, D. E. and Christianson, D. W. (2001) Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 13543-13548.
25. Starks, C. M., Back, K., Chappell, J. and Noel, J. P. (1997) Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-*epi*-aristolochene synthase. *Science* 277, 1815-1820.
26. Schmidt, C. O. (1998) Biosynthese der Sesquiterpene (+)-Germacren D, (-)-Germacren D und (-)- α -Gurjunen in *Solidago canadensis* - Enzymisolierungen und Aufklärung der Bildungsmechanismen. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg.
27. Altug, I. (2003) Isolation of cDNAs encoding (+)-and (-)-Germacrene D Synthase, α -Gurjunene- and Cascarilladiene Synthase from *Solidago canadensis* L. and their functional Expression in *E. coli*. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg.
28. Croteau, R. and Cane, D. E. (1985) Monoterpene and sesquiterpene cyclases. In John H. Law and Hans C. Rilling, editors. *Methods in Enzymology: Part A: Steroids and Isoprenoids*, Academic Press.
29. Cane, D. E., Zhen, W., Oliver, J. S. and Hohn, T. M. (1993) Overproduction of Soluble Trichodiene Synthase from *Fusarium sporotrichioides* in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 300, 416-422.
30. Prosser, I., Altug, I. G., Phillips, A. L., König, W. A., Bouwmeester, H. J. and Beale, M. H. (2004) Enantiospecific (+)- and (-)-germacrene D synthases, cloned from goldenrod, reveal a functionally active variant of the universal isoprenoid-biosynthesis aspartate-rich motif. *Arch. Biochem. Biophys.* 432, 136-144.
31. Lane, K. T. and Beese, L. S. (2006) Thematic review series: lipid posttranslational modifications. Structural biology of protein farnesyltransferase and geranylgeranyltransferase type I. *J. Lipid Res.* 47, 681-699.
32. Winter-Vann, A. M. and Casey, P. J. (2005) Post-prenylation-processing enzymes as new targets in oncogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 5, 405-412.

33. Park, H. W., Boduluri, S. R., Moomaw, J. F., Casey, P. J. and Beese, L. S. (1997) Crystal structure of protein farnesyltransferase at 2.25 angstrom resolution. *Science* 275, 1800-1804.
34. Huang, C.-C., Hightower, K. E. and Fierke, C. A. (2000) Mechanistic Studies of Rat Protein Farnesyltransferase Indicate an Associative Transition State. *Biochemistry* 39, 2593-2602.
35. Saderholm, M. J., Hightower, K. E. and Fierke, C. A. (2000) Role of Metals in the Reaction Catalyzed by Protein Farnesyltransferase. *Biochemistry* 39, 12398-12405.
36. Bowers, K. E. and Fierke, C. A. (2004) Positively charged side chains in protein farnesyltransferase enhance catalysis by stabilizing the formation of the diphosphate leaving group. *Biochemistry* 43, 5256-5265.
37. Pickett, J. S., Bowers, K. E., Hartman, H. L., Fu, H. W., Embry, A. C., Casey, P. J. and Fierke, C. A. (2003) Kinetic studies of protein farnesyltransferase mutants establish active substrate conformation. *Biochemistry* 42, 9741-9748.
38. Pickett, J. S., Bowers, K. E. and Fierke, C. A. (2003) Mutagenesis studies of protein farnesyltransferase implicate aspartate β 352 as a magnesium ligand. *J. Biol. Chem.* 278, 51243-51250.
39. Sousa, S. F., Fernandes, P. A. and Ramos, M. J. (2005) Unraveling the mechanism of the farnesyltransferase enzyme. *J. Biol. Inorg. Chem.* 10, 3-10.
40. Reid, T. S., Terry, K. L., Casey, P. J. and Beese, L. S. (2004) Crystallographic analysis of CaaX prenyltransferases complexed with substrates defines rules of protein substrate selectivity. *J. Mol. Biol.* 343, 417-433.
41. Hougland, J. L., Lamphear, C. L., Scott, S. A., Gibbs, R. A. and Fierke, C. A. (2009) Context-Dependent Substrate Recognition by Protein Farnesyltransferase. *Biochemistry* 48, 1691–1701.
42. Gelb, M. H., Brunsveld, L., Hrycyna, C. A., Michaelis, S., Tamanoi, F., Van Voorhis, W. C. and Waldmann, H. (2006) Therapeutic intervention based on protein prenylation and associated modifications. *Nat. Chem. Biol.* 2, 518-528.
43. Hancock, J. F. (2003) Ras proteins: different signals from different locations. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 373-384.

44. Adjei, A. A. (2001) Blocking oncogenic Ras signaling for cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 93, 1062-1074.
45. Downward, J. (2003) Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 3, 11-22.
46. Pan, J. and Yeung, S. C. (2005) Recent advances in understanding the antineoplastic mechanisms of farnesyltransferase inhibitors. *Cancer Res.* 65, 9109-9112.
47. Liu, G., Marrinan, C. H., Taylor, S. A., Black, S., Basso, A. D., Kirschmeier, P., Robert Bishop, W., Liu, M. and Long, B. J. (2007) Enhancement of the antitumor activity of tamoxifen and anastrozole by the farnesyltransferase inhibitor lonafarnib (SCH66336). *Anti-Cancer Drugs* 18, 923-931.
48. Mayer, M. and Meyer, B. (1999) Characterization of Ligand Binding by Saturation Transfer Difference NMR Spectroscopy. *Angew. Chem. Int. Edit.* 38, 1784-1788.
49. Vogtherr, M. and Peters, T. (2000) Application of NMR Based Binding Assays to Identify Key Hydroxy Groups for Intermolecular Recognition. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 6093-6099.
50. Mayer, M. (2001) STD-NMR-Spektroskopie: Eine neue Methode zur Identifizierung und Charakterisierung von Ligand-Rezeptor-Interaktionen. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg.
51. Mayer, M. and Meyer, B. (2001) Group epitope mapping by saturation transfer difference NMR to identify segments of a ligand in direct contact with a protein receptor. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 6108-6117.
52. Meyer, B. and Peters, T. (2003) NMR spectroscopy techniques for screening and identifying ligand binding to protein receptors. *Angew. Chem. Int. Edit.* 42, 864-890.
53. Biet T. and Peters T. (2001) Molecular Recognition of UDP-Gal by β -1,4-Galactosyltransferase T113. *Angew. Chem. Int. Edit.* 40, 4189-4192.
54. Brecker, L., Straganz, G. D., Tyl, C. E., Steiner, W. and Nidetzky, B. (2006) Saturation-transfer-difference NMR to characterize substrate binding recognition and catalysis of two broadly specific glycoside hydrolases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 42, 85-89.

55. Deamer, D. W. (1986) Role of amphiphilic compounds in the evolution of membrane structure on the early earth. *Orig. Life Evol. Biosph.* 17, 3-25.
56. Wennerström, H. and Lindman, B. (1979) Micelles. Physical chemistry of surfactant association. *Phys. Rep. Rev. Sec. Phys. Lett.* 52, 1-86.
57. Yuan, H. Z., Tan, X. L., Cheng, G. Z., Zhao, S., Zhang, L., Mao, S. Z., An, J. Y., Yu, J. Y. and Du, Y. R. (2003) Micellization of Sodium Decyl Naphthalene Sulfonate Studied by ^1H NMR. *J. Phys. Chem. B* 107, 3644-3649.
58. Shimizu, S., Pires, P. A. R., Fish, H., Halstead, T. K. and Seoud, O. A. E. (2003) Proton and carbon-13 NMR study of the aggregation of benzyl(2-acylaminoethyl)-dimethylammonium chloride surfactants in D_2O . *Phys. Chem. Chem. Phys.* 5, 3489-3497.
59. Lesemann, M., Thirumoorthy, K., Kim, Y. J., Jonas, J. and Paulaitis, M. E. (1998) Pressure Dependence of the Critical Micelle Concentration of a Nonionic Surfactant in Water Studied by ^1H -NMR. *Langmuir* 14, 5339-5341.
60. Attwood, D., Waigh, R., Blundell, R., Bloor, D., Thévand, A., Boitard, E., Dubčs, J. P. and Tachoire, H. (1994) ^1H and ^{13}C NMR studies of the self-association of chlorpromazine hydrochloride in aqueous solution. *Magn. Reson. Chem.* 32, 468-472.
61. Wennerstroem, H., Lindman, B., Soederman, O., Drakenberg, T. and Rosenholm, J. B. (1979) Carbon-13 magnetic relaxation in micellar solutions. Influence of aggregate motion on T_1 . *J. Am. Chem. Soc.* 101, 6860-6864.
62. Müller, N. and Johnson, T. W. (1969) Investigation of micelle structure by fluorine magnetic resonance. III. Effect of organic additives on sodium 12,12,12-trifluorododecyl sulfate solutions. *J. Phys. Chem.* 73, 2042-2046.
63. Claasen, B. (2005) Synthese und Charakterisierung von peptidischen Liganden des zellulären, humanen Prionproteins: Inhibition der Aggregation des Prionproteins. Dissertation, Universität Hamburg, Hamburg.
64. Jayalakshmi, V. and Krishna, N. R. (2002) Complete relaxation and conformational exchange matrix (CORCEMA) analysis of intermolecular saturation transfer effects in reversibly forming ligand-receptor complexes. *J. Magn. Reson.* 155, 106-118.

65. Liu, M., Mao, X., Ye, C., Huang, H., Nicholson, J. K. and Lindon, J. C. (1998) Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy. *J. Mag. Res.* 132, 125-129.
66. Hwang, T. L. and Shaka, A. J. (1995) Water Suppression That Works. Excitation Sculpting Using Arbitrary Wave-Forms and Pulsed-Field Gradients. *J. Magn. Reson., Series A* 112, 275-279.
67. Meyer, B. (2009) Dependence of the STD effect on kinetic constants of the binding reaction and on NMR relaxation parameters. *Unveröffentlichte Ergebnisse*.
68. Meinecke, R. and Meyer, B. (2001) Determination of the Binding Specificity of an Integral Membrane Protein by Saturation Transfer Difference NMR: RGD Peptide Ligands Binding to Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$. *J. Med. Chem.* 44, 3059-3065.
69. Klein, J., Meinecke, R., Mayer, M. and Meyer, B. (1999) Detecting Binding Affinity to Immobilized Receptor Proteins in Compound Libraries by HR-MAS STD NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 5336-5337.
70. Claasen, B., Axmann, M., Meinecke, R. and Meyer, B. (2005) Direct Observation of Ligand Binding to Membrane Proteins in Living Cells by a Saturation Transfer Double Difference (STDD) NMR Spectroscopy Method Shows a Significantly Higher Affinity of Integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ in Native Platelets than in Liposomes. *J. Am. Chem. Soc.* 127, 916-919.
71. Claridge, T. D. W. (2009) *High-Resolution NMR Techniques in Organic Chemistry*, 2. Auflage, Elsevier, Oxford, Amsterdam.
72. Friebolin, H. (1999) *Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie: Eine Einführung*, 3. Auflage, Wiley-VCH, Weinheim.
73. Turbadar, T. (1959) Complete Absorption of Light by Thin Metal Films. *Proc. Phys. Soc.* 73, 40-44.
74. Jonsson, U., Fagerstam, L., Ivarsson, B., Johnsson, B., Karlsson, R., Lundh, K., Lofas, S., Persson, B., Roos, H. and Ronnberg, I. (1991) Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology. *Biotechniques* 11, 620-627.

75. Xing, L., Tjarnlund, K., Lindqvist, B., Kaplan, G. G., Feigelstock, D., Cheng, R. H. and Casasnovas, J. M. (2000) Distinct cellular receptor interactions in poliovirus and rhinoviruses. *EMBO J.* 19, 1207-1216.
76. Quinn, J. G. , O'Neill, S., Doyle, A., McAtamney, C., Diamond, D., MacCraith, B. D. and O'Kennedy, R. (2000) Development and application of surface plasmon resonance-based biosensors for the detection of cell-ligand interactions. *Anal. Biochem.* 281, 135-143.
77. Holmes, S. D., May, K., Johansson, V., Markey, F. and Critchley, I. A. (1997) Studies on the interaction of staphylococcus aureus and staphylococcus epidermidis with fibronectin using surface plasmon resonance (BIAcore). *J. Microbiol. Methods* 28, 77-84.
78. Cane, D. E., Chiu, H. T., Liang, P. H. and Anderson, K. S. (1997) Pre-steady-state kinetic analysis of the trichodiene synthase reaction pathway. *Biochemistry* 36, 8332-8339.
79. Briggs, G. E. and Haldane, J. B. (1925) A Note on the Kinetics of Enzyme Action. *Biochem. J.* 19, 338-339.
80. Fersht, A. (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*, 1st Edition, W. H. Freeman and Company, New York.
81. Philo, R. D. and Selwyn, M. J. (1973) Use of progress curves to investigate product inhibition in enzyme-catalysed reactions. Application to the soluble mitochondrial adenosine triphosphatase. *Biochem. J.* 135, 525-530.
82. Vandenberg, J. I., Kuchel, P. W. and King, G. F. (1986) Application of progress curve analysis to in situ enzyme kinetics using ¹H NMR spectroscopy. *Arch. Biochem. Biophys.* 155, 38-44.
83. Balcom, J. K. and Fitch, W. M. (1970) A method for the kinetic analysis of progress curves using horse serum cholinesterase as a model case. *J. Biol. Chem.* 245, 1637-1647.
84. Koerber, S. C. and Fink, A. L. (1987) The analysis of enzyme progress curves by numerical differentiation, including competitive product inhibition and enzyme reactivation. *Arch. Biochem. Biophys.* 165, 75-87.

85. Goudar, C. T., Harris, S. K., McInerney, M. J. and Suflita, J. M. (2004) Progress curve analysis for enzyme and microbial kinetic reactions using explicit solutions based on the Lambert W function. *J. Microbiol. Methods* 59, 317-326.
86. Goudar, C. T., Sonnad, J. R. and Duggleby, R. G. (1999) Parameter estimation using a direct solution of the integrated Michaelis-Menten equation. *Biochim. Biophys. Acta* 1429, 377-383.
87. Barry, D. A., Culligan-Hensley, P. J. and Barry, S. J. (1995) Real Values of the {W}-Function. *ACM T. Math. Software* 21, 161-171.
88. Barry, D. A., Culligan-Hensley, P. J. and Barry, S. J. (1995) Algorithm 743: WAPR: A Fortran Routine for Calculating Real Values of the {W}-Function. *ACM T. Math. Software* 21, 172-181.
89. Berman, H., Henrick, K. and Nakamura, H. (2003) Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 10, 980.
90. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. and Bourne, P. E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235-242.
91. The UniProt Consortium (2008) The Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic Acids Res.* 36, D190-195.
92. Bordoli, L., Kiefer, F., Arnold, K., Benkert, P., Battey, J. and Schwede, T. (2009) Protein structure homology modeling using SWISS-MODEL workspace. *Nat. Protoc.* 4, 1-13.
93. Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J. and Schwede, T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* 22, 195-201.
94. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N. and Peitsch, M. C. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* 31, 3381-3385.
95. Kunz, R. (1997) *Molecular Modelling für Anwender*, 2. Auflage, Teubner Verlag, Stuttgart.

96. Lide, D. R. and Frederikse, H. P. R. (1995) *CRC Handbook of Chemistry and Physics: A Ready-reference Book of Chemical and Physical Data*, 76th Edition, CRC Press, London.
97. Picaud, S., Brodelius, M. and Brodelius, P. E. (2005) Expression, purification and characterization of recombinant (*E*)- β -farnesene synthase from *Artemisia annua*. *Phytochemistry* 66, 961-967.
98. Zahn, T. J., Eilers, M., Guo, Z., Ksebati, M. B., Simon, M., Scholten, J. D., Smith, S. O. and Gibbs, R. A. (2000) Evaluation of Isoprenoid Conformation in Solution and in the Active Site of Protein-Farnesyl Transferase Using Carbon-13 Labeling in Conjunction with Solution- and Solid-State NMR. *J. Am. Chem. Soc.* 122, 7153-7164.
99. Jiang, X.-K. (1988) Hydrophobic-lipophilic interactions. Aggregation and self-coiling of organic molecules. *Acc. Chem. Res.* 21, 362-367.
100. Jiang, X.-K., Ji, G.-Z., Tu, B., Zhang, X.-Y., Shi, J.-L. and Chen, X. (1995) Shape and Aggregating Tendency. The Aggregating Behavior of Eight Esters of Eight-Carbon Carboxylic Acids. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 12679-12682.
101. Gardner, R. R., Christianson, L. A. and Gellman, S. H. (1997) Quantitative Analysis of Hydrophobically Induced Folding in a Minimal Model System. *J. Am. Chem. Soc.* 119, 5041-5042.
102. Evertsson, H., Nilsson, S., Welch, C. J. and Sundelof, L.-O. (1998) Molecular Dynamics in Dilute Aqueous Solutions of Ethyl(hydroxyethyl)cellulose and Sodium Dodecyl Sulfate As Investigated by Proton NMR Relaxation. *Langmuir* 14, 6403-6408.
103. Karlsson, R. and Stahlberg, R. (1995) Surface plasmon resonance detection and multispot sensing for direct monitoring of interactions involving low-molecular-weight analytes and for determination of low affinities. *Anal. Biochem.* 228, 274-280.
104. Duggleby, R. G. (1994) Product inhibition of reversible enzyme-catalysed reactions. *Biochim. Biophys. Acta - Prot. Struct. Mol. Enzymol.* 1209, 238-240.
105. Schmidt, N. D., Peschon, J. J. and Segel, I. H. (1983) Kinetics of enzymes subject to very strong product inhibition: Analysis using simplified integrated rate equations and average velocities. *J. Theor. Biol.* 100, 597-611.

106. Long, S. B., Casey, P. J. and Beese, L. S. (2002) Reaction path of protein farnesyltransferase at atomic resolution. *Nature* 419, 645-650.
107. Qian, Y., Sebti, S. M. and Hamilton, A. D. (1997) Farnesyltransferase as a target for anticancer drug design. *Biopolymers* 43, 25-41.
108. Wellings, D. A. and Atherton, E. (1997) Standard Fmoc protocols. In Gregg B. Fields, editor. *Methods in Enzymology: Solid-Phase Peptide Synthesis*, Academic Press.
109. Whittington, D. A., Wise, M. L., Urbansky, M., Coates, R. M., Croteau, R. B. and Christianson, D. W. (2002) Bornyl diphosphate synthase: structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15375-15380.
110. Hyatt, D. C., Youn, B., Zhao, Y., Santhamma, B., Coates, R. M., Croteau, R. B. and Kang, C. (2007) Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 5360-5365.
111. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947-2948.
112. Pace, C. N., Vajdos, F., Fee, L., Grimsley, G. and Gray, T. (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Sci.* 4, 2411-2423.
113. Gottlieb, H. E., Kotlyar, V. and Nudelman, A. (1997) NMR Chemical Shifts of Common Laboratory Solvents as Trace Impurities. *J. Org. Chem.* 62, 7512-7515.
114. Gasteiger, J. and Marsili, M. (1980) Iterative partial equalization of orbital electronegativity-a rapid access to atomic charges. *Tetrahedron* 36, 3219-3228.

10 ANHANG

10.1 Sequenz der (+)-Germacren D Synthase

1 MAAKHVEAIR PAANYQYHPS LWGDQFLHYD EREDEHVEVD QQIEILKEET RKEILASLDD
61 PAKHTNLLKL IDVIQRLGIA YYFEHEITQA LDHIYNVYGD EWNGGSTSLW FRLLRQQGFY
121 VSCDIFNIYK LDNGSFKDSL TKDIECMLEL YEAAVMRVQG EIILDEALEF TKTHLEQIAK
181 DPLRCNNTLS RHIHEALELP VQKRLPRLDA IRYIPFYEQQ DSHNKSLRL AKLGFNRLQS
241 LHKKELSQLS KWWKEFDAPK NVPYARDRLV EHYFWILGVY FEPQYSRSRI FLAKIITMTA
301 ILNDTYDIYG TYEELEIFTK ALQTWSTCMD TFPDYMKVIY KSLLDIYEEM EEIMEKNGKA
361 YQVDYAKEAM RELTGGYMA EAKLLHEGHV PTFEEHNKIT NLSAGHKMLS TSSFVGM PGD
421 IVTQDSFKWA LNNPRLITAS AYIGRILNDI VGHKEEQQRK HIPSIVEMYM KEHNLLREDV
481 YDLLKQRVED AWKDLNRETL TCKDIHMSLK MCPINLARVE HKIYKNGDNL KFVGQEIQDY
541 IKSCFINAMS V

10.2 Modifizierte Pulsprogramme

Pulsprogramm *tliresgp.th*

Das Pulsprogramm basiert auf dem Bruker-Pulsprogramm *tlir*. Das *excitation sculpting* Impulsarray (*zgesgp*) wurde eingefügt und der Phasenzzyklus angepasst.

```
;tliresgp.th
;avance-version
;T1 measurement using inversion recovery
;1D sequence
;water suppression using excitation sculpting with gradients
;T.-L. Hwang & A.J. Shaka, J. Magn. Reson.,
;Series A 112 275-279 (1995)
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

"p2=p1*2"
"d12=20u"
"d11=30m"

1 ze
2 30m
  d12 p11:f1 BLKGRAD
  d1
  p2 ph1
  vd
  p1 ph2

  50u UNBLKGRAD
  p16:gp1
  d16 p10:f1
  (p12:sp1 ph3:r):f1
  4u
  d12 p11:f1

  p2 ph4

  4u
  p16:gp1
  d16
  50u
  p16:gp2
  d16 p10:f1
  (p12:sp1 ph5:r):f1
  4u
  d12 p11:f1

  p2 ph6

  4u
  p16:gp2
  d16
```

```

go=2 ph31
d11 wr #0 if #0 ivd
lo to 1 times tdl
4u BLKGRAD
exit

ph1=0 2
ph2=0 0 2 2 1 1 3 3
ph3=0 1
ph4=2 3
ph5=0 0 1 1
ph6=2 2 3 3
ph31=0 2 0 2 1 3 1 3

;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;sp1 : f1 channel - shaped pulse 180 degree
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p12: f1 channel - 180 degree shaped pulse (Squa100.1000) [2 msec]
;p16: homospoil/gradient pulse
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;NS: 8 * n, total number of scans: NS * TD0
;DS: 4

;use gradient ratio:      gp 1 : gp 2
;                          31 : 11

;for z-only gradients:
;gpz1: 31%
;gpz2: 11%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100

```

Pulsprogramm *std.t4_w5.th*

Das Pulsprogramm basiert auf einem modifizierten Pulsprogramm *std.t4_3.bc* (Dr. Birgit Claasen). Das p3919 (*w3*) Impulsarray wurde durch ein *w5* Impulsarray ersetzt.

```

std.t4_w5.th
;avance-version (03/10/10)
;1D sequence
;for saturation transfer difference
;with shaped pulse train for saturation on f2 channel
;with spinlock to suppress protein signals
;alternating between on and off resonance
;to be defined by fq2list
;
;M. Mayer & B. Meyer, Angew. Chem. Int. Ed. 38, 1784-1788 (1999)
;M. Mayer & B. Meyer, Angew. Chem. 111, 1902-1906 (1999).

```

```
#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>
```

```
"d12=20u"
```

```
"p29=d29"
```

```
"15=d20/p13+0.5"
"d31=p13*15"
```

```
"DELTA1=d1-d31"
```

```
1 ze
  10u st0
2 30m
  4u BLKGRAD
  d12 fq2:f2 st
```

```
50u UNBLKGRAD
4u pl10:f1
(p17 ph2)
(p17*2 ph3)
4u
p30:gp1
10m pl1:f1
4u BLKGRAD
```

```
DELTA1
```

```
3 (p13:sp13 ph4):f2
4u
lo to 3 times 15
```

```
p1 ph1
```

```
4u pl29:f1
(p29 ph21)
```

```
50u UNBLKGRAD
p16:gp2
d16 pl18:f1
p28*0.0867 ph5
d19*2
p28*0.2056 ph5
d19*2
p28*0.4133 ph5
d19*2
p28*0.7822 ph5
d19*2
p28*1.4911 ph5
d19*2
p28*1.4911 ph6
d19*2
p28*0.7822 ph6
```

```
d19*2
p28*0.4133 ph6
d19*2
p28*0.2056 ph6
d19*2
p0*0.0867 ph6
46u
p16:gp2 d16
go=2 ph31
30m wr #0 if #0
4u BLKGRAD
d31
exit
```

```
ph1=0 0 2 2
ph2=0
ph3=1
ph4=0
ph5=0 0 1 1 2 2 3 3
ph6=2 2 3 3 0 0 1 1
ph21=1 1 3 3
ph31=0 2 0 2
```

```
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default) [120 dB]
;p110: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock
;p129: f1 channel - power level as for TOCSY-spinlock
;sp13: f2 channel - shaped pulse for saturation [35 - 60 dB]
;p1 : f1 channel - high power pulse
;p13: f2 channel - shaped pulse for saturation [50 msec]
;p17: f1 channel - trim pulse [2.5 msec]
;p29: f1 channel - trim pulse
;p30: gradient pulse [5 msec]
;d1 : relaxation delay: 1-5 * T1
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d20: saturation time
;d29: spinlock time [10 - 50 msec]
;d31: saturation time as executed
;l5: loop for saturation: (p11 + d20) * 15 = saturation time
;NS: 16 * n, total number of scans: NS * TD0
;DS: 16
;gp1: gradient for spinlock
;gp2: gradient for watersupression
;define FQ2LIST (irradiation frequencies, alternating on/off resonance)
; (list has to be stored in "/u/exp/stan/nmr/lists/fl")

;use gradient ratio: gp 1
; 40

;for z-only gradients:
;gpz1: 40%
;gpz2: 20%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100

;$Id: $
```

Pulsprogramm *stddiffesgp2d.th*

Das Pulsprogramm basiert auf dem Bruker-Pulsprogramm *stddiffesgp.3*. Die Zeile 103 (d11 wr #0) wurde um den Befehl if #0 erweitert (d11 wr #0 if #0).

```
;stddiffesgp2d.th
;avance-version (05/12/06)
;pseudo 2D sequence
;for saturation transfer difference
;with shaped pulse train for saturation on f2 channel
;alternating between on and off resonance
;  to be defined by fq2list
;with spoil sequence to destroy unwanted magnetization
;water suppression using excitation sculpting with gradients
;with spinlock to suppress protein signals
;(use parameterset STDDIFFESGP.3)
;
;M. Mayer & B. Meyer, Angew. Chem. Int. Ed. 38, 1784-1788 (1999)
;M. Mayer & B. Meyer, Angew. Chem. 111, 1902-1906 (1999).
;T.-L. Hwang & A.J. Shaka, J. Magn. Reson.,
;  Series A 112 275-279 (1995)
;
;$CLASS=HighRes
;$DIM=2D
;$TYPE=
;$SUBTYPE=
;$COMMENT=

prosol relations=<triple>

#include <Avance.incl>
#include <Grad.incl>
#include <Delay.incl>

"p2=p1*2"
"d12=20u"
"d11=30m"

"p29=d29"

"15=d20/p13+0.5"
"d31=p13*15"

"DELTA1=d1-d31"

1 ze
  3m fq2:f2 st0
2 3m
3 3m
4 d11
  6m

5 50u UNBLKGRAD
  4u p110:f1
  (p17 ph2)
```

```

(p17*2 ph3)
4u
p30:gp1
10m p11:f1
4u BLKGRAD

DELTA1

6 (p13:sp13 ph4):f2
4u
lo to 6 times 15

p1 ph1
4u p129:f1
(p29 ph5)

50u UNBLKGRAD
p16:gp2
d16 p10:f1
(p12:sp1 ph6:r):f1
4u
d12 p11:f1

p2 ph7

4u
p16:gp2
d16
50u
p16:gp3
d16 p10:f1
(p12:sp1 ph8:r):f1
4u
d12 p11:f1

p2 ph9

p16:gp3
d16
4u BLKGRAD

goscnp ph31

3m fq2:f2 st
lo to 3 times nbl
3m ipp1 ipp5 ipp6 ipp7 ipp8 ipp9 ipp31
lo to 4 times ns
d11 wr #0 if #0
3m rpp1 rpp5 rpp6 rpp7 rpp8 rpp9 rpp31
3m zd
lo to 5 times l4
exit

ph1=0 2
ph2=0
ph3=1
ph4=0
ph5=1 1 1 1 1 1 1 3 3 3 3 3 3 3
ph6=0 0 1 1
ph7=2 2 3 3

```

```
ph8=0 0 0 0 1 1 1 1
ph9=2 2 2 2 3 3 3 3
ph31=0 2 2 0 2 0 0 2
```

```
;p10 : 120dB
;p11 : f1 channel - power level for pulse (default)
;p12 : f2 channel - power level for pulse (default) [120 dB]
;p110: f1 channel - power level for TOCSY-spinlock
;p129: f1 channel - power level for trim pulse
;sp1 : f1 channel - shaped pulse 180 degree
;sp13: f2 channel - shaped pulse for saturation [40 - 60 dB]
;p1 : f1 channel - 90 degree high power pulse
;p2 : f1 channel - 180 degree high power pulse
;p12: f1 channel - 180 degree shaped pulse (Squa100.1000) [2 msec]
;p13: f2 channel - shaped pulse for saturation [50 msec]
;p16: homospoil/gradient pulse
;p17: f1 channel - trim pulse [2.5 msec]
;p29: f1 channel - trim pulse
;p30: gradient pulse [3 msec]
;d1 : relaxation delay; 1-5 * T1
;d11: delay for disk I/O [30 msec]
;d12: delay for power switching [20 usec]
;d16: delay for homospoil/gradient recovery
;d20: saturation time
;d29: spinlock time [10 - 50 msec]
;d31: saturation time as executed
;l4: 14 = number of averages = (total number of scans) / NS
;l5: loop for saturation: p13 * 15 = saturation time
;NS: 8 * n
;DS: 4
;td1: number of experiments
;NBL: NBL = number of irradiation frequencies

;define FQ2LIST (irradiation frequencies)
; (list has to be stored in "/u/exp/stan/nmr/lists/f1")

;use gradient ratio: gp 1 : gp 2 : gp 3
; 40 : 31 : 11

;for z-only gradients:
;gpz1: 40%
;gpz2: 31%
;gpz3: 11%

;use gradient files:
;gpnam1: SINE.100
;gpnam2: SINE.100
;gpnam3: SINE.100
```

```
;this pulse program produces a ser-file (PARMOD = 2D)
```

10.3 CLUSTAL W Multiple Alignment

CLUSTAL 2.0.8 multiple sequence alignment

```

5EAT_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      MASAAVANYEEEEIVRPVADFS--PSLWGDQFLSFSIDNQVAEKYAEIEA 48
5EAS_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      MASAAVANYEEEEIVRPVADFS--PSLWGDQFLSFSIDNQVAEKYAEIEA 48
5EAU_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      MASAAVANYEEEEIVRPVADFS--PSLWGDQFLSFSIDNQVAEKYAEIEA 48
pGdsynth                          -----MAAKHVEAIRPAANYQYHPSLWGDQFLHYDEREDEHVEVDQQIEI 45
1N1B_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      -----EAHQIRRSNGYQ--PALWDSNYIQSLNTPYTEERHLDRKAE 39
1N1B_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      -----EAHQIRRSNGYQ--PALWDSNYIQSLNTPYTEERHLDRKAE 39
2ONG_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      -----MRRSGNYN--PSRWDVNFIQSLLSDYKEDKHKVIRASE 35
2ONG_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      -----MRRSGNYN--PSRWDVNFIQSLLSDYKEDKHKVIRASE 35
                                     :*  .:.  *: *. .:.  .  .

5EAT_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LKEQTRSMLLATG---RKLADTLNLDIIERLGISYHFEKEIDEILDQIY 95
5EAS_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LKEQTRSMLLATG---RKLADTLNLDIIERLGISYHFEKEIDEILDQIY 95
5EAU_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LKEQTRSMLLATG---MKLADTLNLDIIERLGISYHFEKEIDEILDQIY 95
pGdsynth                          LKEETRKEILASLDDPAKHTNLLKLDVIQRLGIAYFFEHEITQALDHIY 95
1N1B_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LIVQVRILLKEKM----EPVQQLELIHDLKYLGLSDFFQDEIKEILGVIY 85
1N1B_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LIVQVRILLKEKM----EPVQQLELIHDLKYLGLSDFFQDEIKEILGVIY 85
2ONG_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LVTLVKMELEKET----DQIRQLELIDDLQRMGLSDHFQNEFKEILSSIY 81
2ONG_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LVTLVKMELEKET----DQIRQLELIDDLQRMGLSDHFQNEFKEILSSIY 81
*   .:  :   .   *:* . : : *:* . : : * . **

5EAT_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      NQN-----SNCNDLCTSALQFRLLRQHGFNISPEIFSKFQDENG-KF 136
5EAS_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      NQN-----SNCNDLCTSALQFRLLRQHGFNISPEIFSKFQDENG-KF 136
5EAU_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      NQN-----SNCNDLCTSALQFRLLRQHGFNISPEIFSKFQDENG-KF 136
pGdsynth                          NVY-----GDEWNGGSTSLWFRLLRQGGFYVSCDIFNIYKLDNG-SF 136
1N1B_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      NEHKCFHN-NEVEKMDLYFTALGFRLLRQHGFNISQDVFNCFKNEKGIDF 134
1N1B_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      NEHKCFHN-NEVEKMDLYFTALGFRLLRQHGFNISQDVFNCFKNEKGIDF 134
2ONG_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LDHYYKKNPFPEERDLYSTSLAFRLLRHGFGVQAEVFDSPKNEEG-EF 130
2ONG_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LDHYYKKNPFPEERDLYSTSLAFRLLRHGFGVQAEVFDSPKNEEG-EF 130
                                     :  :   ::* *****:* : : :*. : : :* . *

5EAT_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KESLASDVLGLLNLYEASHVRTHADDILEDALAFSTIHLESAAP----HL 182
5EAS_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KESLASDVLGLLNLYEASHVRTHADDILEDALAFSTIHLESAAP----HL 182
5EAU_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KESLASDVLGLLNLYEASHVRTHADDILEDALAFSTIHLESAAP----HL 182
pGdsynth                          KDSLTKDIECMLELYEAYMRVQGEIILDEALEFTKTHLEQIAKDP-RC 185
1N1B_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KASLAQDTKGMQLQLYEASFLLRKGEDTLELAREFATKCLQKLLDEGNEI 184
1N1B_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KASLAQDTKGMQLQLYEASFLLRKGEDTLELAREFATKCLQKLLDEGNEI 184
2ONG_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KESLSDTRGILLQLYEASFLLTEGETTLESAREFATKFLLEEKVNEGG--V 178
2ONG_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KESLSDTRGILLQLYEASFLLTEGETTLESAREFATKFLLEEKVNEGG--V 178
* * : . *   : : * * * * * : . :   * : * * * . * : .

5EAT_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KSPLEQVTHALEQCLHKGVPRVETRFFISSIYDKEQSKNNVLLRFKLD 232
5EAS_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KSPLEQVTHALEQCLHKGVPRVETRFFISSIYDKEQSKNNVLLRFKLD 232
5EAU_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      KSPLEQVTHALEQCLHKGVPRVETRFFISSIYDKEQSKNNVLLRFKLD 232
pGdsynth                          NNTLSRHIHEALELPVQKRLPRDAIRYIP-FYEQQDSHNKSLRLAKLG 234
1N1B_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      DENLLLWIRHSLDPLHWRIQSVEARWFIDAYARRPD-MNPLIFELAKLN 233
1N1B_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      DENLLLWIRHSLDPLHWRIQSVEARWFIDAYARRPD-MNPLIFELAKLN 233
2ONG_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      DGDLLTRIAYSLDIPLHWRIKRPNAPVWIEWYRKRPD-MNPVLELAILD 227
2ONG_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      DGDLLTRIAYSLDIPLHWRIKRPNAPVWIEWYRKRPD-MNPVLELAILD 227
.  *   :  : * : : :   :   : : *   : :   *   : : : * * .

5EAT_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      FNLLQMLHKQELAQVSRWWKDLDFVTTLPYARDRVVECYFWALGVYFEPQ 282
5EAS_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      FNLLQMLHKQELAQVSRWWKDLDFVTTLPYARDRVVECYFWALGVYFEPQ 282
5EAU_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      FNLLQMLHKQELAQVSRWWKDLDFVTTLPYARDRVVECYFWALGVYFEPQ 282
pGdsynth                          FNRLQSLHKKELSQLSKWKEFDAPKNVPYARDRLVEHYFWILGVYFEPQ 284
1N1B_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      FNI IQATHQQLKDLRWSRSLCFPEKLPFVRDRLVESFFWAVGMFEPHQ 283
1N1B_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      FNI IQATHQQLKDLRWSRSLCFPEKLPFVRDRLVESFFWAVGMFEPHQ 283
2ONG_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LNIVQAQFQELKESFRWRNTGFVEKLPFARDRLVECYFWNTGII EPRQ 277
2ONG_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      LNIVQAQFQELKESFRWRNTGFVEKLPFARDRLVECYFWNTGII EPRQ 277
* : *   . : * * :   * *   . : : . * * * * * * * * * * *

5EAT_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      YSQARVMLVKTISMSIVDDTFDAYGTVKELEAYTDAIQRWDINEIDRLP 332
5EAS_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      YSQARVMLVKTISMSIVDDTFDAYGTVKELEAYTDAIQRWDINEIDRLP 332
5EAU_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      YSQARVMLVKTISMSIVDDTFDAYGTVKELEAYTDAIQRWDINEIDRLP 332
pGdsynth                          YRSRIFLAKIITMTAILNDTYDIYGTYYEELEIFTKALQTWST-CMDTFP 333
1N1B_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      HGYQRKMAATIIVLATVIDDIYDVYGTLELELFTDTFKRWDTESITRLP 333
1N1B_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      HGYQRKMAATIIVLATVIDDIYDVYGTLELELFTDTFKRWDTESITRLP 333
2ONG_A|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      HASARIMMGKVNALITVIDDIYDVYGTLELELQFTDLIRRWDINSIDQLP 327
2ONG_B|PDBID|CHAIN|SEQUENCE      HASARIMMGKVNALITVIDDIYDVYGTLELELQFTDLIRRWDINSIDQLP 327
:.  *   :   .   : : : * * * * * * * * * * * : *   :   : *
    
```

| | | |
|-----------------------------------|--|-----|
| 5EAT_A PDBID CHAIN SEQUENCE | DYMKISYKAILDLYKDYEKELSSAGRSHIVCHAIERMKEVVRN-YNVEST | 381 |
| 5EAS_A PDBID CHAIN SEQUENCE | DYMKISYKAILDLYKDYEKELSSAGRSHIVCHAIERMKEVVRN-YNVEST | 381 |
| 5EAU_A PDBID CHAIN SEQUENCE | DYMKISYKAILDLYKDYEKELSSAGRSHIVCHAIERMKEVVRN-YNVEST | 381 |
| pGdsynth | DYMKVIYKSLLDIYEEMEEIMEKNGKAYQVDYAKEAMRELLTGGYMAEAK | 383 |
| 1N1B_A PDBID CHAIN SEQUENCE | YYMQLCYWGWHNYISDAAYDILKEHGFFCLOQLRKSVDLVEA-YFHEAK | 382 |
| 1N1B_B PDBID CHAIN SEQUENCE | YYMQLCYWGWHNYISDAAYDILKEHGFFCLOQLRKSVDLVEA-YFHEAK | 382 |
| 2ONG_A PDBID CHAIN SEQUENCE | DYMQLCFLALNMFVDDTSYDVMKEKGVNVIPLYRQSWVDLADK-YMVEAR | 376 |
| 2ONG_B PDBID CHAIN SEQUENCE | DYMQLCFLALNMFVDDTSYDVMKEKGVNVIPLYRQSWVDLADK-YMVEAR | 376 |
| | **:: : . : . : : . : : : : * * : | |
| 5EAT_A PDBID CHAIN SEQUENCE | WFIEGYTPPVSEYLSNALATTTYLLATTSYLGMS--ATEQDFEWLSKN | 429 |
| 5EAS_A PDBID CHAIN SEQUENCE | WFIEGYTPPVSEYLSNALATTTYLLATTSYLGMS--ATEQDFEWLSKN | 429 |
| 5EAU_A PDBID CHAIN SEQUENCE | WFIEGYTPPVSEYLSNALATTTYLLATTSYLGMS--ATEQDFEWLSKN | 429 |
| pGdsynth | LLHEGHVPTFEEHNKI TNLSAGHKMLSTSSVFGMPGDIVTQDSFKWALNN | 433 |
| 1N1B_A PDBID CHAIN SEQUENCE | WYHSGYTPSLDEYLNIAKISVASPAII SPTYFTFANASHDTAVIDSLYQY | 432 |
| 1N1B_B PDBID CHAIN SEQUENCE | WYHSGYTPSLDEYLNIAKISVASPAII SPTYFTFANASHDTAVIDSLYQY | 432 |
| 2ONG_A PDBID CHAIN SEQUENCE | WFYGGHKPSLEEYLENSWQSIGPCMLTHIFFRVT-DSFTKETVDSLYKY | 425 |
| 2ONG_B PDBID CHAIN SEQUENCE | WFYGGHKPSLEEYLENSWQSIGPCMLTHIFFRVT-DSFTKETVDSLYKY | 425 |
| | * : * . . * : . : : : : : . . : | |
| 5EAT_A PDBID CHAIN SEQUENCE | PKILEASVIIICRVIDDTATYEVEKSRGQIATGIECCMRDYGISTKEAMAK | 479 |
| 5EAS_A PDBID CHAIN SEQUENCE | PKILEASVIIICRVIDDTATYEVEKSRGQIATGIECCMRDYGISTKEAMAK | 479 |
| 5EAU_A PDBID CHAIN SEQUENCE | PKILEASVIIICRVIDDTATYEVEKSRGQIATGIECCMRDYGISTKEAMAK | 479 |
| pGdsynth | PRLITASAYIGRILNDIVGHKEEQQRKHIP SILVEMYKHEHLLREDVYDL | 483 |
| 1N1B_A PDBID CHAIN SEQUENCE | HDILCLAGIILRLPDDLGTSYFELARGDVPKTIQCYMKETNASEEEAVEH | 482 |
| 1N1B_B PDBID CHAIN SEQUENCE | HDILCLAGIILRLPDDLGTSYFELARGDVPKTIQCYMKETNASEEEAVEH | 482 |
| 2ONG_A PDBID CHAIN SEQUENCE | HDLVRWSSFVLRLLADDLGTSVEEVSARGDVPKSLQCYMSDYNASEAEARKH | 475 |
| 2ONG_B PDBID CHAIN SEQUENCE | HDLVRWSSFVLRLLADDLGTSVEEVSARGDVPKSLQCYMSDYNASEAEARKH | 475 |
| | :: : : * : * * * . . . : : * : . . : | |
| 5EAT_A PDBID CHAIN SEQUENCE | FQNMAETAWKDINEG-LLRPTPVSTEFLLTPILNLARIVEVTYIHNLDGYT | 528 |
| 5EAS_A PDBID CHAIN SEQUENCE | FQNMAETAWKDINEG-LLRPTPVSTEFLLTPILNLARIVEVTYIHNLDGYT | 528 |
| 5EAU_A PDBID CHAIN SEQUENCE | FQNMAETAWKDINEG-LLRPTPVSTEFLLTPILNLARIVEVTYIHNLDGYT | 528 |
| pGdsynth | LKQRVEDAWKDLNRE-TLTCKDIHMSLMKCPINLARVEHKIYK-NGDNLK | 531 |
| 1N1B_A PDBID CHAIN SEQUENCE | VKFLIREAWKDMNTA-IAAGYFPDGMVAGAANIGRVAQFIYL-HGDGFG | 530 |
| 1N1B_B PDBID CHAIN SEQUENCE | VKFLIREAWKDMNTA-IAAGYFPDGMVAGAANIGRVAQFIYL-HGDGFG | 530 |
| 2ONG_A PDBID CHAIN SEQUENCE | VKWLIAEVWKKMNAERVSFKDSFFGKDFIGCAVDLGRMAQLMYH-NGDGHG | 524 |
| 2ONG_B PDBID CHAIN SEQUENCE | VKWLIAEVWKKMNAERVSFKDSFFGKDFIGCAVDLGRMAQLMYH-NGDGHG | 524 |
| | . : . * . . * : . : : : * : * : * : | |
| 5EAT_A PDBID CHAIN SEQUENCE | HPEEVLKPHIINLLVDSIKI | 548 |
| 5EAS_A PDBID CHAIN SEQUENCE | HPEKVLKPHIINLLVDSIKI | 548 |
| 5EAU_A PDBID CHAIN SEQUENCE | HPEKVLKPHIINLLVDSIKI | 548 |
| pGdsynth | FVGQEIQDYIKSCFINAMSV | 551 |
| 1N1B_A PDBID CHAIN SEQUENCE | VQHSKTYEHIAGLLFEPYA- | 549 |
| 1N1B_B PDBID CHAIN SEQUENCE | VQHSKTYEHIAGLLFEPYA- | 549 |
| 2ONG_A PDBID CHAIN SEQUENCE | TQHPIIHQQMTRTLFEPFA- | 543 |
| 2ONG_B PDBID CHAIN SEQUENCE | TQHPIIHQQMTRTLFEPFA- | 543 |
| | : : . . . | |

10.4 Daten des Homologymodeling

SWISS MODEL WORKSPACE

An Automated Comparative Protein Modelling Server

Workunit: P000097

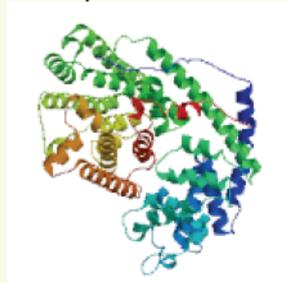
Title: PGDS

overview pic



Model Details: Batch.1

model pic



Target:
modelled residue
range: 1 to 538

Alignment

```

pGDsynth  14          NYQYH PSLWGDQFLH YDEREDEHVE VDQQIEILKE
5EAT      17          vadfs pslwgdqfls fsidnqvaek yaqeiealke

pGDsynth                   hhhhhh hhhhhhhhhh
5EAT                       hhhhhh hhhhhhhhhh

pGDsynth  49      ETRKEILASL DDPAKHTNLL KLIDVIQLRG IAYYFEHEIT QALDHIYNVY
5EAT      52      qtrsmllatg ---rkladt1 nliidierlg isyhfekeid eildqiynqn

pGDsynth          hhhhhhh      hhhhh hhhhhhhh      hhhhh hhhhhhhh
5EAT              hhhhhh      hhhhh hhhhhhhh      hhhhh hhhhhhhh

pGDsynth  99      GDEWNGGSTS LWFRLRQQG FYVSCDIFNI YKLDNGSFKD SLTKDIECML
5EAT      99      sncndlctsa lqfrllrqhg fnispeifsk fqdengkfke slasdvlgll

pGDsynth          hhhhh hhhhhhhhhh      h  h          hhh
5EAT              hhhhh hhhhhhhhhh      h  h          hhh

pGDsynth  149     ELYEAAVMRV QGEIILDEAL EFTKTHLEQI AKDPLRCNNT LSRHIHEALE
5EAT      149     nlyeashvrt haddiledal afstihlesa aphl---ksp lreqvthale

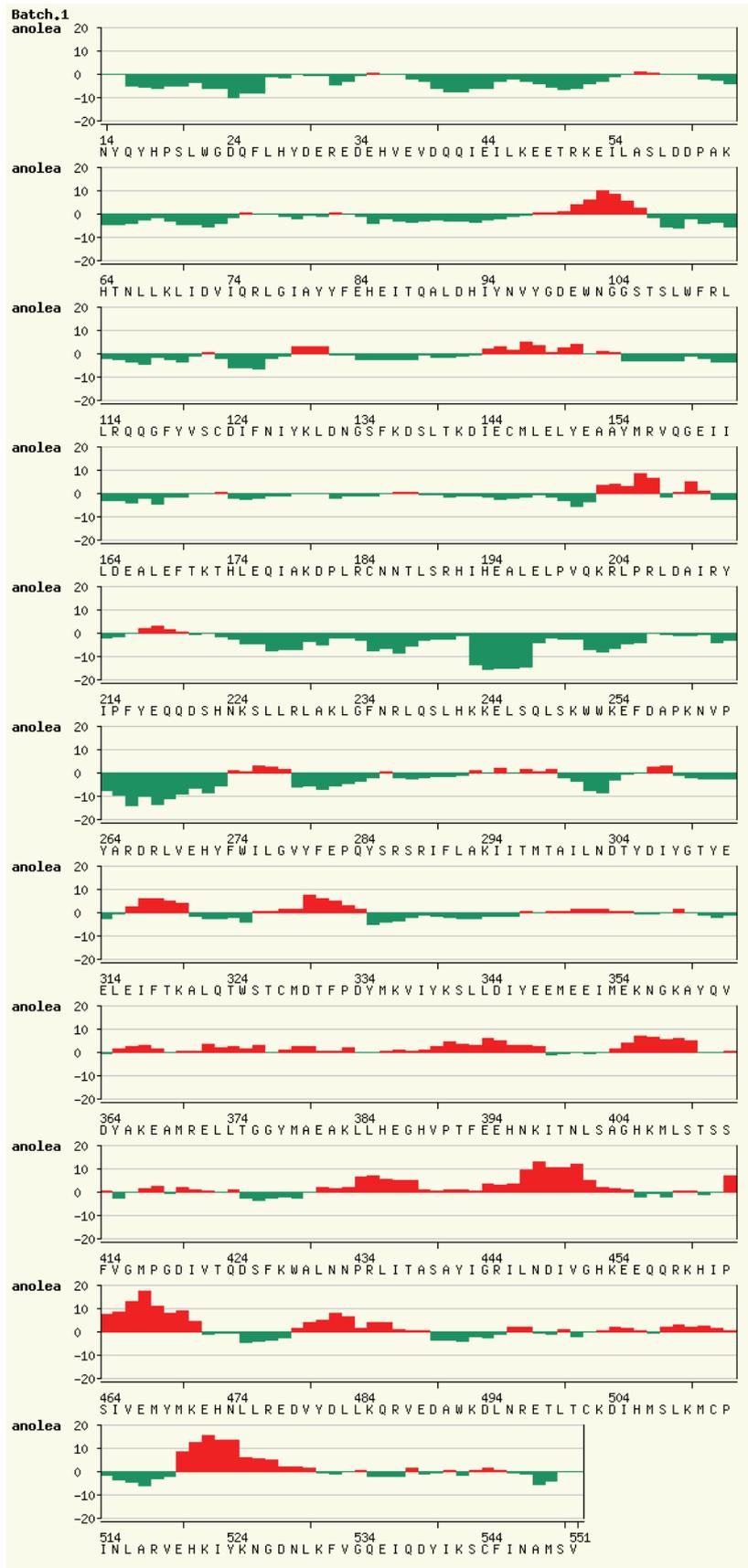
```

| | | | | | | |
|----------|-----|--------------|------------|------------------|-------------|---------------|
| pGDsynth | | hhhhhh | | hh hhhhhhhhhh h | | hhhhhhhhhh |
| 5EAT | | hhhhhhh | | hhh hhhhhhhhhh h | | hhhhhhhhhh |
| pGDsynth | 199 | LPVQKRLPRL | DAIRYIPFY- | EQQDSHNKSL | LRLAKLGFNR | LQSLHKKELS |
| 5EAT | 196 | qclhkgvprv | etrffissiy | dkeqsknnvl | lrfakldfnl | lqmlhkqela |
| pGDsynth | | hhh hhhhhhhh | | hhh hhhhhhhhhh | | hhhhhhhhhh |
| 5EAT | | hhh hhhhhhhh | | hhh hhhhhhhhhh | | hhhhhhhhhh |
| pGDsynth | 248 | QLSKWKEFD | APKNVPYARD | RLVEHYFWIL | GVYFEPQYSR | SRIFLAKIIT |
| 5EAT | 246 | qvsrwwkdld | fvttlpyard | rvvecyfwal | gvyfepqysq | arvmlvktis |
| pGDsynth | | hhhhhhhh | hhh | hhhhhhhhh hh | hh | hhhhhhhhhh |
| 5EAT | | hhhhhhhh | hhh | hhhhhhhhh h | hh | hhhhhhhhhh |
| pGDsynth | 298 | MTAILNDTYD | IYGTYELEI | FTKALQTWST | CM-DTFPDYM | KVIYKSLLDI |
| 5EAT | 296 | misivddtfd | aygtvkelea | ytdaiqrwdi | neidrlpdym | kisykaildl |
| pGDsynth | | hhhhhhhhhh | hhhhh | hhhhhhh | hhh | hhhhhhhhhh |
| 5EAT | | hhhhhhhhhh | hhhhh | hhhhhhh | h | hhh hhhhhhhhh |
| pGDsynth | 347 | YEEMEEIMEK | NGKAYQVDYA | KEAMRELLTG | GYMAEAKLLH | EGHVPTFEEH |
| 5EAT | 346 | ykdyekelss | agrshivcha | iermkevvr- | nynvestwfi | egytpvsey |
| pGDsynth | | hhhhh | h h | hhh hhhhhhhh | hhhhhhhhh h | hhhh |
| 5EAT | | hhhhh | h h | hhh hhhhhhhh | hhhhhhhhh h | hhhh |
| pGDsynth | 397 | NKITNLSAGH | KMLSTSSFVG | MPGDIVTQDS | FKWALNNPRL | ITASAYIGRI |
| 5EAT | 395 | lsnalattty | yylattsyg | mksa--teqd | fewlsknpki | leasviicrv |
| pGDsynth | | h hhh | hhhhhhhhh | hh hhhh | hh | hhhhhhhhhh |
| 5EAT | | h hhh | hhhhhhhhh | hh hhhh | hh | hhhhhhhhhh |
| pGDsynth | 447 | LNDIVGHKEE | QQRKHIPSIV | EMYMKEHNLL | REDVYDLLKQ | RVEDAWKDLN |
| 5EAT | 443 | iddtatyve | ksrgqiatgi | eccmrdygis | tkeamakfqn | maetawkdin |
| pGDsynth | | hhhh | hhh hh | hh hhhhhhh | hhhhhhhhh | hhhhhhhhhh |
| 5EAT | | hhhh | hhh hh | hh hhhhhhh | hhhhhhhhh | hhhhhhhhhh |
| pGDsynth | 497 | RETLTCKDIH | MSLKMCPINL | ARVEHKIYK- | NGDNLKFVGQ | EIQDYIKSCF |
| 5EAT | 493 | egllrptpvs | tefltpilnl | arivevtyih | nldgythpee | vlkphiinll |
| pGDsynth | | hh | hhhhh | hhhhhhh | | hhhhhhh |
| 5EAT | | hh | hhhhh | hhhhhhh | hh | hhhhhhhhh |
| pGDsynth | 546 | INAMSV | | | | |
| 5EAT | 543 | vsiki- | | | | |
| pGDsynth | | | | | | |
| 5EAT | | | | | | |

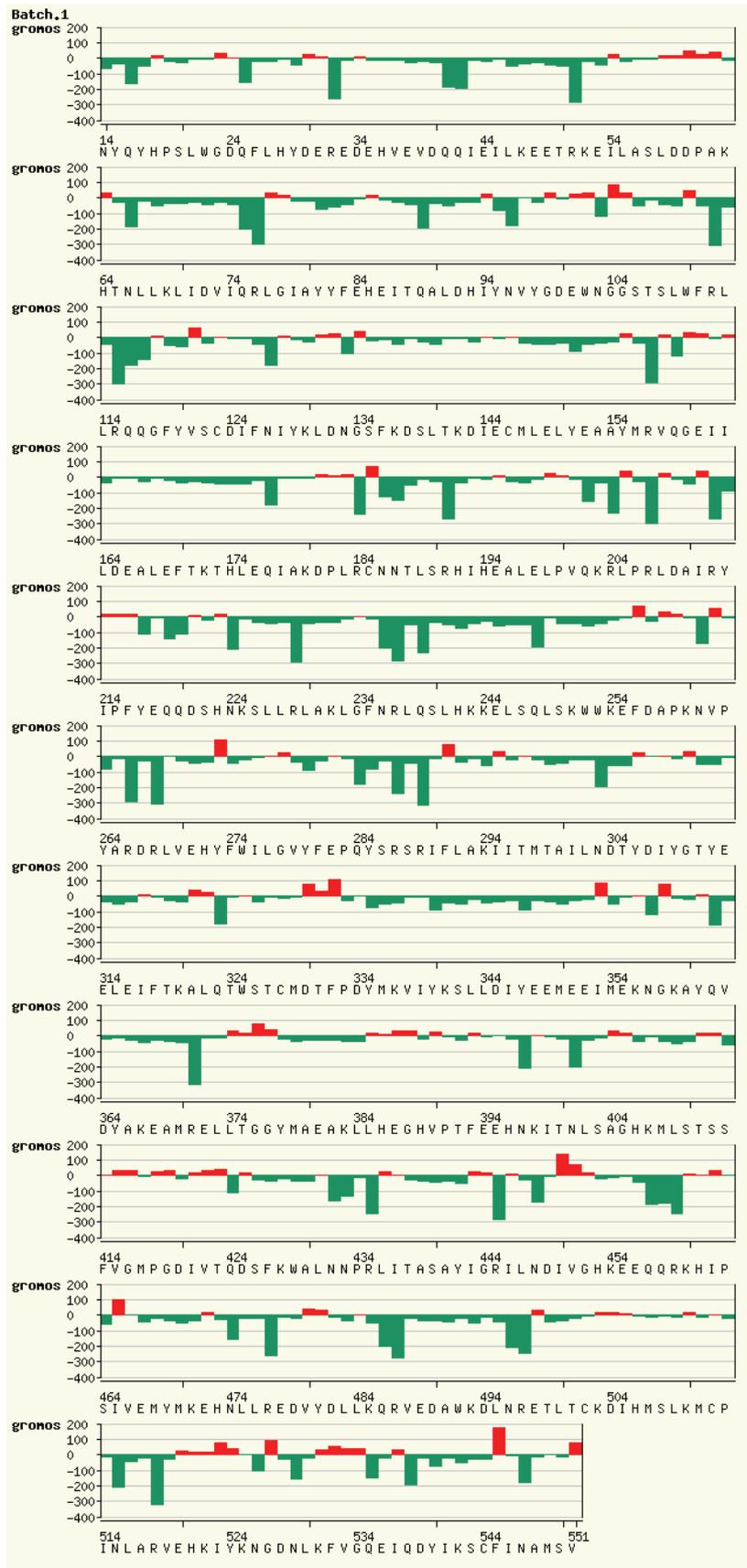
Modeling log für das Homologiemodell der (+)-Germacren D Synthase

```
3.70 (SP3)
ProModII: Loading Project File: Batch.1
N-terminal overhang trimmed for chain ' '. Start at residue:
ProModII: adding blocking groups
Adding Missing Sidechains
AddPolar H
BuildDeletetedLoopsModel
Trying Ligating with anchor residues TYR 217 and GLN 220
Number of Ligations found: 4
ACCEPTING loop 3: clash= 0 FF= 78.6 PP= -7.00
Trying Ligating with anchor residues CYS 328 and THR 331
Number of Ligations found: 8
ACCEPTING loop 1: clash= 0 FF= -100.7 PP= -5.00
Trying Ligating with anchor residues TYR 524 and GLY 527
Number of Ligations found: 10
ACCEPTING loop 6: clash= 0 FF= 888.7 PP= -3.00
Building CSP loop with anchor residues LEU 58 and ALA 62
Building CSP loop with anchor residues SER 57 and ALA 62
Number of Ligations found: 24
ACCEPTING loop 4: clash= 0 FF= 72.8 PP= -4.00
Building CSP loop with anchor residues PRO 182 and ASN 186
Building CSP loop with anchor residues ASP 181 and ASN 186
Number of Ligations found: 155
ACCEPTING loop 30: clash= 0 FF= -276.6 PP=-11.00
Building CSP loop with anchor residues THR 375 and TYR 378
Number of Ligations found: 11
ACCEPTING loop 10: clash= 0 FF= 220.6 PP= -3.00
Building CSP loop with anchor residues ASP 420 and THR 423
Building CSP loop with anchor residues GLY 419 and THR 423
Building CSP loop with anchor residues GLY 419 and GLN 424
Number of Ligations found: 240
ACCEPTING loop 168: clash= 0 FF= 68.6 PP= -2.00
Optimizing Sidechains
Adding Hydrogens
Optimizing loops and OXT (nb = 28)
Final Total Energy: -23332.398 KJ/mol
Dumping Sequence Alignment
```

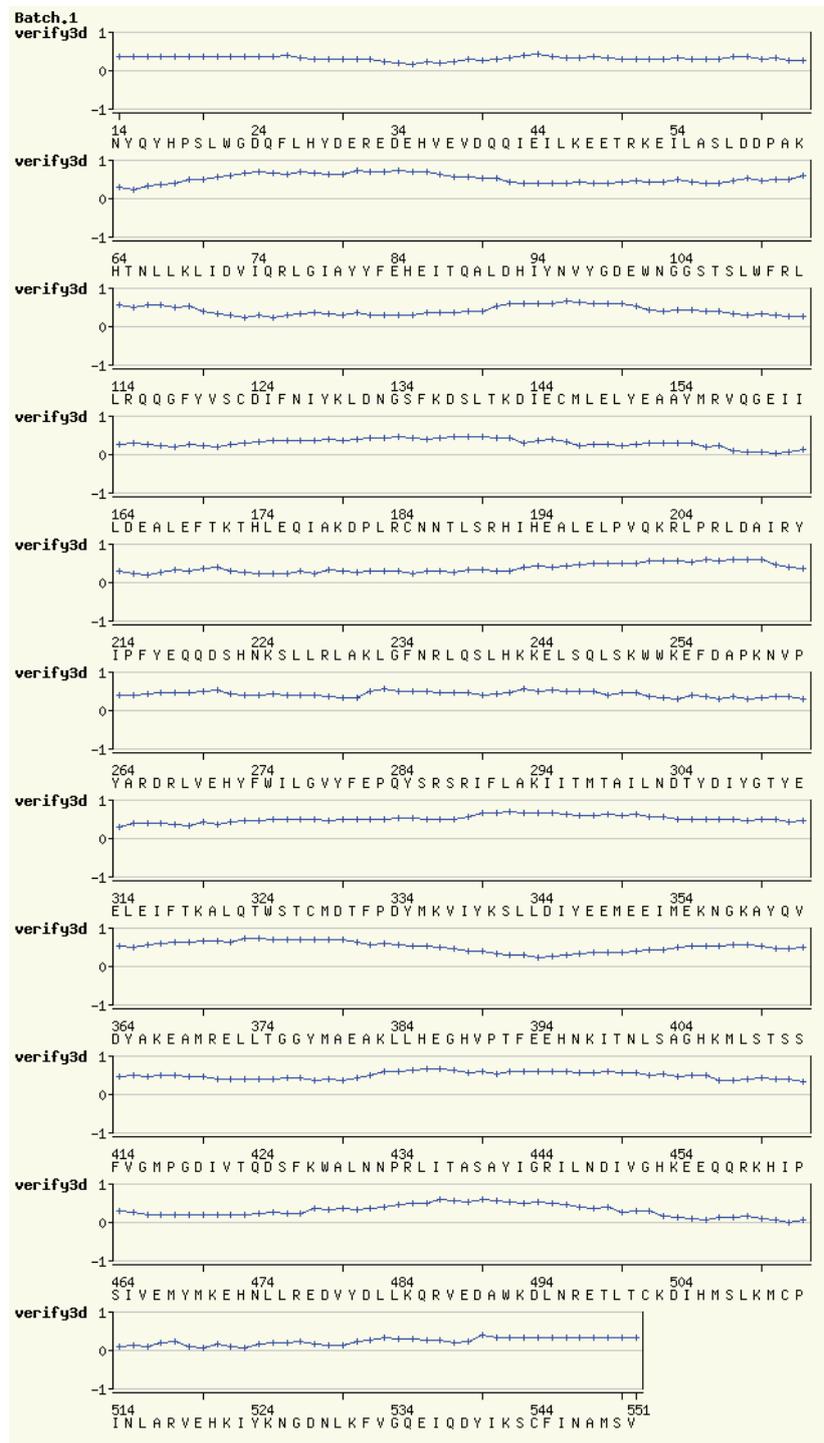
Energie des Homologiemodells der (+)-Germacren D Synthese nach ANOLEA



Energie des Homologiemodells der (+)-Germacren D Synthese nach GROMOS



Überprüfung der 3D-Struktur des Homologiemodells der (+)-Germacren D Synthase nach Verify 3D



10.5 Proton-Proton-Abstände des Farnesyldiphosphat

Tabelle 92: Proton-Proton-Abstände Farnesyldiphosphat H-1.

| Atom 1 | Atom 2 | Abstand r [Å] | $1/r^6$ |
|-------------|------------|---------------|------------|
| ARG266.HH12 | FHP900.H1 | 3.746 | 0.0003619 |
| ARG266.HH22 | FHP900.H1 | 4.418 | 0.00013448 |
| ARG445.HH22 | FHP900.H1 | 4.73 | 8.9296E-05 |
| ASN303.HD21 | FHP900.H1 | 3.733 | 0.00036953 |
| ASN303.HD22 | FHP900.H1 | 3.693 | 0.00039421 |
| ASN448.HB2 | FHP900.H1 | 4.707 | 9.1946E-05 |
| ASN448.HD21 | FHP900.H1 | 4.023 | 0.00023588 |
| ASN448.HD22 | FHP900.H1 | 3.367 | 0.00068634 |
| FHP900.H10 | FHP900.H1 | 4.631 | 0.00010138 |
| FHP900.H12 | FHP900.H1 | 4.689 | 9.4085E-05 |
| FHP900.H13 | FHP900.H1 | 2.381 | 0.00548837 |
| FHP900.H18 | FHP900.H1 | 2.511 | 0.00398951 |
| FHP900.H22 | FHP900.H1 | 2.622 | 0.00307754 |
| FHP900.H2 | FHP900.H1 | 2.766 | 0.00223299 |
| FHP900.H4 | FHP900.H1 | 4.681 | 9.5054E-05 |
| FHP900.H6 | FHP900.H1 | 4.4 | 0.00013781 |
| FHP900.H7 | FHP900.H1 | 3.796 | 0.00033423 |
| TYR524.HH | FHP900.H1 | 4.156 | 0.00019406 |
| ALA404.HA | FHP900.H25 | 4.096 | 0.00021176 |
| ARG266.HH12 | FHP900.H25 | 4.545 | 0.00011345 |
| ARG266.HH22 | FHP900.H25 | 4.374 | 0.0001428 |
| ARG445.HH12 | FHP900.H25 | 4.108 | 0.00020807 |
| ARG445.HH22 | FHP900.H25 | 4.511 | 0.00011868 |
| ASN303.HD21 | FHP900.H25 | 2.7 | 0.00258117 |
| ASN303.HD22 | FHP900.H25 | 2.413 | 0.00506589 |
| ASN448.HD22 | FHP900.H25 | 4.736 | 8.862E-05 |
| FHP900.H10 | FHP900.H25 | 4.806 | 8.1152E-05 |
| FHP900.H18 | FHP900.H25 | 2.984 | 0.00141647 |
| FHP900.H2 | FHP900.H25 | 3.084 | 0.00116229 |
| FHP900.H22 | FHP900.H25 | 2.427 | 0.00489307 |
| FHP900.H3 | FHP900.H25 | 4.737 | 8.8507E-05 |
| FHP900.H4 | FHP900.H25 | 4.635 | 0.00010086 |
| FHP900.H7 | FHP900.H25 | 4.731 | 8.9183E-05 |
| TYR378.HE1 | FHP900.H25 | 3.747 | 0.00036132 |
| TYR378.HH | FHP900.H25 | 3.691 | 0.00039549 |

Tabelle 93: Proton-Proton-Abstände Farnesyldiphosphat H-2.

| Atom 1 | Atom 2 | Abstand r [Å] | $1/r^6$ |
|-------------|-----------|---------------|------------|
| ALA404.HA | FHP900.H2 | 3.775 | 0.00034554 |
| ALA404.HB1 | FHP900.H2 | 4.903 | 7.1983E-05 |
| ARG445.HH11 | FHP900.H2 | 4.604 | 0.000105 |
| ARG445.HH21 | FHP900.H2 | 3.845 | 0.00030947 |
| ALA404.HB2 | FHP900.H2 | 4.456 | 0.00012774 |
| ARG445.HA | FHP900.H2 | 4.343 | 0.00014903 |

| | | | |
|-------------|-----------|-------|------------|
| ARG445.HH12 | FHP900.H2 | 3.378 | 0.00067304 |
| ARG445.HH22 | FHP900.H2 | 2.814 | 0.00201398 |
| ASN448.HA | FHP900.H2 | 4.925 | 7.0075E-05 |
| ASN448.HB2 | FHP900.H2 | 2.825 | 0.00196738 |
| ASN448.HB3 | FHP900.H2 | 2.9 | 0.00168117 |
| ASN448.HD21 | FHP900.H2 | 3.726 | 0.00037372 |
| ASN448.HD22 | FHP900.H2 | 3.658 | 0.00041739 |
| FHP900.H1 | FHP900.H2 | 2.766 | 0.00223299 |
| FHP900.H13 | FHP900.H2 | 4.439 | 0.0001307 |
| FHP900.H22 | FHP900.H2 | 3.789 | 0.00033795 |
| FHP900.H25 | FHP900.H2 | 3.084 | 0.00116229 |
| FHP900.H3 | FHP900.H2 | 3.674 | 0.0004066 |
| FHP900.H4 | FHP900.H2 | 2.486 | 0.00423636 |
| FHP900.H5 | FHP900.H2 | 4.299 | 0.00015841 |
| FHP900.H6 | FHP900.H2 | 3.035 | 0.00127952 |
| FHP900.H7 | FHP900.H2 | 4.011 | 0.00024015 |
| TYR524.HH | FHP900.H2 | 4.394 | 0.00013894 |

Tabelle 94: Proton-Proton-Abstände Farnesyldiphosphat H-4.

| Atom 1 | Atom 2 | Abstand r [Å] | $1/r^6$ |
|-------------|-----------|---------------|------------|
| ALA404.H | FHP900.H3 | 4.997 | 6.4231E-05 |
| ALA404.HA | FHP900.H3 | 2.53 | 0.00381309 |
| ALA404.HB1 | FHP900.H3 | 2.34 | 0.00609123 |
| ARG445.HA | FHP900.H3 | 4.586 | 0.0001075 |
| ARG445.HH12 | FHP900.H3 | 4.971 | 6.6273E-05 |
| FHP900.H10 | FHP900.H3 | 4.722 | 9.0208E-05 |
| FHP900.H19 | FHP900.H3 | 2.448 | 0.00464656 |
| FHP900.H2 | FHP900.H3 | 3.674 | 0.0004066 |
| FHP900.H24 | FHP900.H3 | 2.384 | 0.00544706 |
| FHP900.H25 | FHP900.H3 | 4.737 | 8.8507E-05 |
| FHP900.H5 | FHP900.H3 | 2.459 | 0.00452323 |
| FHP900.H6 | FHP900.H3 | 3.047 | 0.00124958 |
| FHP900.H7 | FHP900.H3 | 3.63 | 0.00043708 |
| FHP900.H9 | FHP900.H3 | 4.95 | 6.7978E-05 |
| GLY405.H | FHP900.H3 | 4.845 | 7.731E-05 |
| HIS406.H | FHP900.H3 | 4.262 | 0.00016685 |
| HIS406.HD1 | FHP900.H3 | 4.302 | 0.00015775 |
| HIS406.HE1 | FHP900.H3 | 3.295 | 0.00078139 |
| ALA404.HA | FHP900.H4 | 2.81 | 0.00203124 |
| ALA404.HB1 | FHP900.H4 | 2.647 | 0.00290721 |
| ARG445.H | FHP900.H4 | 4.664 | 9.7151E-05 |
| ARG445.HA | FHP900.H4 | 3.119 | 0.00108619 |
| ARG445.HB2 | FHP900.H4 | 4.595 | 0.00010624 |
| ARG445.HD2 | FHP900.H4 | 4.758 | 8.6189E-05 |
| ARG445.HH11 | FHP900.H4 | 4.363 | 0.00014497 |
| ARG445.HH12 | FHP900.H4 | 4.044 | 0.00022863 |
| ARG445.HH21 | FHP900.H4 | 4.843 | 7.7502E-05 |
| ARG445.HH22 | FHP900.H4 | 4.344 | 0.00014882 |
| ASN448.H | FHP900.H4 | 4.982 | 6.54E-05 |
| ASN448.HB2 | FHP900.H4 | 3.614 | 0.00044882 |

| | | | |
|------------|-----------|-------|------------|
| ASN448.HB3 | FHP900.H4 | 3.71 | 0.00038349 |
| FHP900.H1 | FHP900.H4 | 4.681 | 9.5054E-05 |
| FHP900.H2 | FHP900.H4 | 2.486 | 0.00423636 |
| FHP900.H21 | FHP900.H4 | 4.984 | 6.5243E-05 |
| FHP900.H24 | FHP900.H4 | 3.684 | 0.00040002 |
| FHP900.H25 | FHP900.H4 | 4.635 | 0.00010086 |
| FHP900.H5 | FHP900.H4 | 2.569 | 0.00347869 |
| FHP900.H6 | FHP900.H4 | 2.424 | 0.00492952 |
| GLY444.HA2 | FHP900.H4 | 4.466 | 0.00012603 |
| HIS406.HD1 | FHP900.H4 | 4.714 | 9.113E-05 |
| HIS406.HE1 | FHP900.H4 | 3.059 | 0.00122046 |

Tabelle 95: Proton-Proton-Abstände Farnesyldiphosphat H-5.

| Atom 1 | Atom 2 | Abstand r [Å] | $1/r^6$ |
|-------------|-----------|---------------|------------|
| ALA404.HA | FHP900.H6 | 4.939 | 6.8892E-05 |
| ALA404.HB1 | FHP900.H6 | 4.698 | 9.3008E-05 |
| ARG445.HA | FHP900.H6 | 4.69 | 9.3964E-05 |
| ASN448.H | FHP900.H6 | 4.525 | 0.00011649 |
| ASN448.HA | FHP900.H6 | 4.963 | 6.6917E-05 |
| ASN448.HB2 | FHP900.H6 | 2.737 | 0.00237876 |
| ASN448.HB3 | FHP900.H6 | 3.953 | 0.00026208 |
| ASN448.HD21 | FHP900.H6 | 4.187 | 0.0001856 |
| FHP900.H1 | FHP900.H6 | 4.4 | 0.00013781 |
| FHP900.H12 | FHP900.H6 | 4.445 | 0.00012965 |
| FHP900.H13 | FHP900.H6 | 4.759 | 8.6081E-05 |
| FHP900.H19 | FHP900.H6 | 3.761 | 0.00035333 |
| FHP900.H2 | FHP900.H6 | 3.035 | 0.00127952 |
| FHP900.H24 | FHP900.H6 | 4.054 | 0.00022527 |
| FHP900.H3 | FHP900.H6 | 3.047 | 0.00124958 |
| FHP900.H4 | FHP900.H6 | 2.424 | 0.00492952 |
| FHP900.H7 | FHP900.H6 | 2.302 | 0.00671998 |
| FHP900.H8 | FHP900.H6 | 4.934 | 6.9311E-05 |
| GLU520.HB2 | FHP900.H6 | 4.968 | 6.6514E-05 |
| GLY444.HA2 | FHP900.H6 | 4.076 | 0.00021807 |
| GLY444.HA3 | FHP900.H6 | 4.756 | 8.6407E-05 |
| HIS406.HE1 | FHP900.H6 | 4.023 | 0.00023588 |
| TRP275.HH2 | FHP900.H6 | 3.593 | 0.00046479 |
| TRP275.HZ2 | FHP900.H6 | 4.692 | 9.3724E-05 |
| TYR524.HE2 | FHP900.H6 | 3.172 | 0.00098175 |
| TYR524.HH | FHP900.H6 | 3.148 | 0.00102752 |
| ALA404.HA | FHP900.H5 | 4.84 | 7.7791E-05 |
| ALA404.HB1 | FHP900.H5 | 3.836 | 0.00031385 |
| ALA404.HB2 | FHP900.H5 | 4.872 | 7.4775E-05 |
| ARG445.H | FHP900.H5 | 4.919 | 7.0589E-05 |
| ARG445.HA | FHP900.H5 | 4.741 | 8.806E-05 |
| ASN448.HB2 | FHP900.H5 | 4.221 | 0.00017681 |
| FHP900.H19 | FHP900.H5 | 2.294 | 0.00686182 |
| FHP900.H2 | FHP900.H5 | 4.299 | 0.00015841 |
| FHP900.H24 | FHP900.H5 | 3.95 | 0.00026328 |
| FHP900.H3 | FHP900.H5 | 2.459 | 0.00452323 |
| FHP900.H4 | FHP900.H5 | 2.569 | 0.00347869 |

| | | | |
|------------|-----------|-------|------------|
| FHP900.H7 | FHP900.H5 | 2.997 | 0.00138 |
| FHP900.H8 | FHP900.H5 | 4.638 | 0.00010047 |
| FHP900.H9 | FHP900.H5 | 4.955 | 6.7568E-05 |
| GLU520.HB2 | FHP900.H5 | 4.575 | 0.00010906 |
| GLU520.HB3 | FHP900.H5 | 4.991 | 6.4696E-05 |
| GLY444.HA2 | FHP900.H5 | 3.161 | 0.00100243 |
| GLY444.HA3 | FHP900.H5 | 4.416 | 0.00013484 |
| HIS406.HD1 | FHP900.H5 | 4.835 | 7.8275E-05 |
| HIS406.HD2 | FHP900.H5 | 4.544 | 0.0001136 |
| HIS406.HE1 | FHP900.H5 | 2.825 | 0.00196738 |
| TRP275.HH2 | FHP900.H5 | 3.735 | 0.00036835 |
| TRP275.HZ2 | FHP900.H5 | 3.784 | 0.00034064 |
| TYR524.HE2 | FHP900.H5 | 3.668 | 0.0004106 |
| TYR524.HH | FHP900.H5 | 4.63 | 0.00010151 |

Tabelle 96: Proton-Proton-Abstände Farnesyldiphosphat H-6.

| Atom 1 | Atom 2 | Abstand r [Å] | $1/r^6$ |
|-------------|-----------|---------------|------------|
| ASN448.HB2 | FHP900.H7 | 4.515 | 0.00011805 |
| ASN448.HD21 | FHP900.H7 | 4.827 | 7.9056E-05 |
| FHP900.H1 | FHP900.H7 | 3.796 | 0.00033423 |
| FHP900.H10 | FHP900.H7 | 3.197 | 0.00093658 |
| FHP900.H11 | FHP900.H7 | 3.94 | 0.00026731 |
| FHP900.H12 | FHP900.H7 | 2.291 | 0.00691591 |
| FHP900.H15 | FHP900.H7 | 3.487 | 0.00055627 |
| FHP900.H18 | FHP900.H7 | 4.354 | 0.00014678 |
| FHP900.H19 | FHP900.H7 | 3.783 | 0.00034118 |
| FHP900.H2 | FHP900.H7 | 4.011 | 0.00024015 |
| FHP900.H22 | FHP900.H7 | 3.035 | 0.00127952 |
| FHP900.H25 | FHP900.H7 | 4.731 | 8.9183E-05 |
| FHP900.H3 | FHP900.H7 | 3.63 | 0.00043708 |
| FHP900.H4 | FHP900.H7 | 3.946 | 0.00026489 |
| FHP900.H5 | FHP900.H7 | 2.997 | 0.00138 |
| FHP900.H6 | FHP900.H7 | 2.302 | 0.00671998 |
| FHP900.H8 | FHP900.H7 | 3.088 | 0.00115328 |
| FHP900.H9 | FHP900.H7 | 3.773 | 0.00034664 |
| ILE523.HD13 | FHP900.H7 | 4.806 | 8.1152E-05 |
| LEU530.HD23 | FHP900.H7 | 4.9 | 7.2248E-05 |
| TRP275.HH2 | FHP900.H7 | 2.925 | 0.00159678 |
| TRP275.HZ2 | FHP900.H7 | 4.417 | 0.00013466 |
| TRP275.HZ3 | FHP900.H7 | 3.949 | 0.00026368 |
| TYR524.HE2 | FHP900.H7 | 4.395 | 0.00013875 |
| TYR524.HH | FHP900.H7 | 2.852 | 0.00185824 |

Tabelle 97: Proton-Proton-Abstände Farnesyldiphosphat H-8.

| Atom 1 | Atom 2 | Abstand r [Å] | $1/r^6$ |
|-------------|-----------|---------------|------------|
| FHP900.H10 | FHP900.H9 | 2.421 | 0.00496628 |
| FHP900.H11 | FHP900.H9 | 2.391 | 0.00535208 |
| FHP900.H12 | FHP900.H9 | 3.715 | 0.00038041 |
| FHP900.H16 | FHP900.H9 | 4.595 | 0.00010624 |
| FHP900.H21 | FHP900.H9 | 2.412 | 0.00507851 |
| FHP900.H24 | FHP900.H9 | 3.598 | 0.00046093 |
| FHP900.H3 | FHP900.H9 | 4.95 | 6.7978E-05 |
| FHP900.H5 | FHP900.H9 | 4.955 | 6.7568E-05 |
| FHP900.H7 | FHP900.H9 | 3.773 | 0.00034664 |
| ILE296.HD11 | FHP900.H9 | 4.25 | 0.00016969 |
| ILE296.HG13 | FHP900.H9 | 3.996 | 0.00024561 |
| ILE296.HG21 | FHP900.H9 | 3.241 | 0.00086283 |
| LEU409.HD12 | FHP900.H9 | 2.522 | 0.00388624 |
| LEU409.HD22 | FHP900.H9 | 4.38 | 0.00014163 |
| LEU409.HG | FHP900.H9 | 4.594 | 0.00010638 |
| TRP275.HH2 | FHP900.H9 | 4.637 | 0.0001006 |
| TRP275.HZ2 | FHP900.H9 | 4.489 | 0.00012221 |
| TRP275.HZ3 | FHP900.H9 | 4.892 | 7.2959E-05 |
| FHP900.H10 | FHP900.H8 | 3.047 | 0.00124958 |
| FHP900.H11 | FHP900.H8 | 2.503 | 0.00406663 |
| FHP900.H12 | FHP900.H8 | 2.548 | 0.00365429 |
| FHP900.H15 | FHP900.H8 | 4.874 | 7.4591E-05 |
| FHP900.H16 | FHP900.H8 | 4.918 | 7.0675E-05 |
| FHP900.H20 | FHP900.H8 | 3.015 | 0.0013313 |
| FHP900.H24 | FHP900.H8 | 4.369 | 0.00014378 |
| FHP900.H5 | FHP900.H8 | 4.638 | 0.00010047 |
| FHP900.H6 | FHP900.H8 | 4.934 | 6.9311E-05 |
| FHP900.H7 | FHP900.H8 | 3.088 | 0.00115328 |
| ILE296.HD11 | FHP900.H8 | 4.532 | 0.00011541 |
| ILE296.HG21 | FHP900.H8 | 4.03 | 0.00023344 |
| LEU409.HD12 | FHP900.H8 | 3.883 | 0.00029174 |
| LEU530.HD23 | FHP900.H8 | 3.98 | 0.00025159 |
| TRP275.HE1 | FHP900.H8 | 4.63 | 0.00010151 |
| TRP275.HE3 | FHP900.H8 | 3.674 | 0.0004066 |
| TRP275.HH2 | FHP900.H8 | 3.116 | 0.00109248 |
| TRP275.HZ2 | FHP900.H8 | 3.474 | 0.00056888 |
| TRP275.HZ3 | FHP900.H8 | 3.183 | 0.00096157 |

Tabelle 98: Proton-Proton-Abstände Farnesyldiphosphat H-9.

| Atom 1 | Atom 2 | Abstand r [Å] | $1/r^6$ |
|-------------|------------|---------------|------------|
| ALA300.HA | FHP900.H10 | 4.918 | 7.0675E-05 |
| ALA300.HB2 | FHP900.H10 | 4.868 | 7.5144E-05 |
| ASN303.HD21 | FHP900.H10 | 4.681 | 9.5054E-05 |
| FHP900.H1 | FHP900.H10 | 4.631 | 0.00010138 |
| FHP900.H12 | FHP900.H10 | 3.071 | 0.00119212 |
| FHP900.H13 | FHP900.H10 | 4.624 | 0.0001023 |
| FHP900.H16 | FHP900.H10 | 2.245 | 0.00781092 |
| FHP900.H21 | FHP900.H10 | 3.689 | 0.00039678 |

| | | | |
|-------------|------------|-------|------------|
| FHP900.H22 | FHP900.H10 | 2.464 | 0.00446844 |
| FHP900.H25 | FHP900.H10 | 4.806 | 8.1152E-05 |
| FHP900.H3 | FHP900.H10 | 4.722 | 9.0208E-05 |
| FHP900.H7 | FHP900.H10 | 3.197 | 0.00093658 |
| FHP900.H8 | FHP900.H10 | 3.047 | 0.00124958 |
| FHP900.H9 | FHP900.H10 | 2.421 | 0.00496628 |
| ILE296.HG21 | FHP900.H10 | 4.055 | 0.00022493 |
| LEU409.HD12 | FHP900.H10 | 4.611 | 0.00010405 |
| LEU530.HD23 | FHP900.H10 | 4.554 | 0.00011211 |
| ALA300.HB2 | FHP900.H11 | 4.113 | 0.00020656 |
| FHP900.H12 | FHP900.H11 | 2.72 | 0.00246937 |
| FHP900.H15 | FHP900.H11 | 4.594 | 0.00010638 |
| FHP900.H16 | FHP900.H11 | 2.945 | 0.00153281 |
| FHP900.H21 | FHP900.H11 | 4.555 | 0.00011196 |
| FHP900.H22 | FHP900.H11 | 4.109 | 0.00020777 |
| FHP900.H7 | FHP900.H11 | 3.94 | 0.00026731 |
| FHP900.H8 | FHP900.H11 | 2.503 | 0.00406663 |
| FHP900.H9 | FHP900.H11 | 2.391 | 0.00535208 |
| HIS272.HD2 | FHP900.H11 | 4.094 | 0.00021238 |
| ILE296.HG13 | FHP900.H11 | 4.988 | 6.4929E-05 |
| ILE296.HG21 | FHP900.H11 | 2.899 | 0.00168465 |
| LEU409.HD12 | FHP900.H11 | 4.609 | 0.00010432 |
| LEU530.HD23 | FHP900.H11 | 3.24 | 0.00086443 |
| TRP275.HE3 | FHP900.H11 | 4.619 | 0.00010297 |
| TRP275.HZ3 | FHP900.H11 | 4.339 | 0.00014985 |

Tabelle 99: Proton-Proton-Abstände Farnesyldiphosphat H-10.

| Atom 1 | Atom 2 | Abstand r [Å] | $1/r^6$ |
|-------------|------------|---------------|------------|
| FHP900.H1 | FHP900.H12 | 4.689 | 9.4085E-05 |
| FHP900.H10 | FHP900.H12 | 3.071 | 0.00119212 |
| FHP900.H11 | FHP900.H12 | 2.72 | 0.00246937 |
| FHP900.H15 | FHP900.H12 | 2.336 | 0.00615408 |
| FHP900.H16 | FHP900.H12 | 3.824 | 0.00031981 |
| FHP900.H22 | FHP900.H12 | 4.047 | 0.00022761 |
| FHP900.H6 | FHP900.H12 | 4.445 | 0.00012965 |
| FHP900.H7 | FHP900.H12 | 2.291 | 0.00691591 |
| FHP900.H8 | FHP900.H12 | 2.548 | 0.00365429 |
| FHP900.H9 | FHP900.H12 | 3.715 | 0.00038041 |
| ILE523.HD13 | FHP900.H12 | 4.245 | 0.0001709 |
| LEU530.HB2 | FHP900.H12 | 3.734 | 0.00036894 |
| LEU530.HB3 | FHP900.H12 | 3.948 | 0.00026408 |
| LEU530.HD11 | FHP900.H12 | 4.939 | 6.8892E-05 |
| LEU530.HD23 | FHP900.H12 | 2.611 | 0.00315616 |
| TRP275.HE3 | FHP900.H12 | 4.139 | 0.0001989 |
| TRP275.HH2 | FHP900.H12 | 3.141 | 0.00104134 |
| TRP275.HZ2 | FHP900.H12 | 4.974 | 6.6034E-05 |
| TRP275.HZ3 | FHP900.H12 | 2.428 | 0.00488099 |
| TYR524.HH | FHP900.H12 | 3.32 | 0.00074674 |

Tabelle 100: Proton-Proton-Abstände Farnesyldiphosphat H-12.

| Atom 1 | Atom 2 | Abstand r [Å] | $1/r^6$ |
|-------------|------------|---------------|------------|
| ARG266.HH22 | FHP900.H22 | 4.817 | 8.0046E-05 |
| ASN303.HD21 | FHP900.H22 | 3.287 | 0.00079287 |
| FHP900.H1 | FHP900.H22 | 2.622 | 0.00307754 |
| FHP900.H10 | FHP900.H22 | 2.464 | 0.00446844 |
| FHP900.H11 | FHP900.H22 | 4.109 | 0.00020777 |
| FHP900.H12 | FHP900.H22 | 4.047 | 0.00022761 |
| FHP900.H13 | FHP900.H22 | 3.789 | 0.00033795 |
| FHP900.H18 | FHP900.H22 | 2.593 | 0.00328992 |
| FHP900.H2 | FHP900.H22 | 3.789 | 0.00033795 |
| FHP900.H25 | FHP900.H22 | 2.427 | 0.00489307 |
| FHP900.H7 | FHP900.H22 | 3.035 | 0.00127952 |
| ALA404.HA | FHP900.H23 | 2.67 | 0.00276015 |
| ALA404.HB2 | FHP900.H23 | 4.978 | 6.5716E-05 |
| ARG445.HH12 | FHP900.H23 | 4.566 | 0.00011035 |
| ASN303.HD22 | FHP900.H23 | 4.016 | 0.00023836 |
| GLY405.HA2 | FHP900.H23 | 4.811 | 8.0647E-05 |
| TYR378.HE1 | FHP900.H23 | 3.947 | 0.00026448 |
| TYR378.HH | FHP900.H23 | 2.531 | 0.00380406 |
| ALA404.HB1 | FHP900.H24 | 4.472 | 0.00012502 |
| ASN303.HD21 | FHP900.H24 | 4.63 | 0.00010151 |
| FHP900.H16 | FHP900.H24 | 3.911 | 0.00027943 |
| FHP900.H21 | FHP900.H24 | 2.938 | 0.00155485 |
| FHP900.H3 | FHP900.H24 | 2.384 | 0.00544706 |
| FHP900.H4 | FHP900.H24 | 3.684 | 0.00040002 |
| FHP900.H5 | FHP900.H24 | 3.95 | 0.00026328 |
| FHP900.H6 | FHP900.H24 | 4.054 | 0.00022527 |
| FHP900.H8 | FHP900.H24 | 4.369 | 0.00014378 |
| FHP900.H9 | FHP900.H24 | 3.598 | 0.00046093 |
| GLY405.HA2 | FHP900.H24 | 4.754 | 8.6625E-05 |

Tabelle 101: Proton-Proton-Abstände Farnesyldiphosphat H-13.

| Atom 1 | Atom 2 | Abstand r [Å] | $1/r^6$ |
|-------------|------------|---------------|------------|
| ALA404.HA | FHP900.H19 | 4.808 | 8.0949E-05 |
| FHP900.H3 | FHP900.H19 | 2.448 | 0.00464656 |
| FHP900.H4 | FHP900.H19 | 3.794 | 0.00033529 |
| FHP900.H5 | FHP900.H19 | 2.294 | 0.00686182 |
| FHP900.H6 | FHP900.H19 | 3.761 | 0.00035333 |
| FHP900.H7 | FHP900.H19 | 3.783 | 0.00034118 |
| GLY444.HA2 | FHP900.H19 | 4.637 | 0.0001006 |
| HIS406.H | FHP900.H19 | 4.215 | 0.00017833 |
| HIS406.HD1 | FHP900.H19 | 4.377 | 0.00014221 |
| HIS406.HE1 | FHP900.H19 | 3.571 | 0.00048224 |
| FHP900.H8 | FHP900.H20 | 3.015 | 0.0013313 |
| HIS406.HD2 | FHP900.H20 | 3.229 | 0.00088225 |
| LEU409.HB2 | FHP900.H20 | 4.834 | 7.8372E-05 |
| LEU409.HD13 | FHP900.H20 | 2.576 | 0.00342235 |
| LEU409.HG | FHP900.H20 | 4.194 | 0.00018375 |
| LEU516.HB3 | FHP900.H20 | 4.917 | 7.0762E-05 |

| | | | |
|-------------|------------|-------|------------|
| TRP275.HE1 | FHP900.H20 | 3.765 | 0.00035108 |
| TRP275.HH2 | FHP900.H20 | 4.186 | 0.00018587 |
| TRP275.HZ2 | FHP900.H20 | 2.873 | 0.00177822 |
| ALA404.HB1 | FHP900.H21 | 4.828 | 7.8958E-05 |
| FHP900.H10 | FHP900.H21 | 3.689 | 0.00039678 |
| FHP900.H11 | FHP900.H21 | 4.555 | 0.00011196 |
| FHP900.H24 | FHP900.H21 | 2.938 | 0.00155485 |
| FHP900.H9 | FHP900.H21 | 2.412 | 0.00507851 |
| GLY405.HA2 | FHP900.H21 | 4.686 | 9.4447E-05 |
| HIS406.HA | FHP900.H21 | 3.876 | 0.00029492 |
| LEU409.HD22 | FHP900.H21 | 4.446 | 0.00012947 |
| LEU409.HG | FHP900.H21 | 3.379 | 0.00067185 |
| LEU516.HD23 | FHP900.H21 | 4.914 | 7.1021E-05 |

Tabelle 102: Proton-Proton-Abstände Farnesyldiphosphat H-14.

| Atom 1 | Atom 2 | Abstand r [Å] | $1/r^3$ |
|-------------|------------|---------------|-------------|
| ALA300.HA | FHP900.H16 | 3.382 | 0.00066828 |
| ALA300.HB2 | FHP900.H16 | 3.881 | 0.000292643 |
| ASN303.HB2 | FHP900.H16 | 4.634 | 0.000100987 |
| ASN303.HB3 | FHP900.H16 | 4.257 | 0.000168027 |
| FHP900.H10 | FHP900.H16 | 2.245 | 0.007810915 |
| FHP900.H11 | FHP900.H16 | 2.945 | 0.00153281 |
| FHP900.H12 | FHP900.H16 | 3.824 | 0.00031981 |
| FHP900.H8 | FHP900.H16 | 4.918 | 7.06755E-05 |
| FHP900.H9 | FHP900.H16 | 4.595 | 0.00010624 |
| TYR378.HH | FHP900.H16 | 4.858 | 7.60773E-05 |
| ALA300.HB1 | FHP900.H17 | 3.677 | 0.000404611 |
| ARG266.HD2 | FHP900.H17 | 4.278 | 0.000163138 |
| ARG266.HD3 | FHP900.H17 | 4.865 | 7.54228E-05 |
| ARG266.HE | FHP900.H17 | 3.924 | 0.000273921 |
| ARG266.HH11 | FHP900.H17 | 3.362 | 0.00069249 |
| ARG266.HH12 | FHP900.H17 | 2.783 | 0.002152389 |
| ARG266.HH21 | FHP900.H17 | 3.266 | 0.000823954 |
| FHP900.H14 | FHP900.H17 | 2.562 | 0.003536106 |
| LEU530.HB3 | FHP900.H17 | 4.845 | 7.73103E-05 |
| LEU530.HD22 | FHP900.H17 | 2.848 | 0.001873959 |
| LEU530.HG | FHP900.H17 | 4.978 | 6.57159E-05 |
| ARG266.HH12 | FHP900.H18 | 2.66 | 0.002822995 |
| ARG266.HH22 | FHP900.H18 | 2.565 | 0.003511363 |
| ASN303.HD21 | FHP900.H18 | 2.663 | 0.002803968 |
| ASN303.HD22 | FHP900.H18 | 3.636 | 0.00043277 |
| FHP900.H1 | FHP900.H18 | 2.511 | 0.003989512 |
| FHP900.H13 | FHP900.H18 | 2.702 | 0.002569733 |
| FHP900.H22 | FHP900.H18 | 2.593 | 0.003289917 |
| FHP900.H25 | FHP900.H18 | 2.984 | 0.001416469 |
| FHP900.H7 | FHP900.H18 | 4.354 | 0.000146781 |
| LEU530.HD22 | FHP900.H18 | 4.16 | 0.000192948 |

Tabelle 103: Proton-Proton-Abstände Farnesyldiphosphat H-15.

| Atom 1 | Atom 2 | Abstand r [Å] | $1/r^6$ |
|-------------|------------|---------------|-------------|
| ASN448.HD21 | FHP900.H13 | 3.691 | 0.00039549 |
| ASN448.HD22 | FHP900.H13 | 3.544 | 0.000504705 |
| FHP900.H1 | FHP900.H13 | 2.381 | 0.005488373 |
| FHP900.H10 | FHP900.H13 | 4.624 | 0.000102304 |
| FHP900.H12 | FHP900.H13 | 3.311 | 0.000759005 |
| FHP900.H2 | FHP900.H13 | 4.439 | 0.000130704 |
| FHP900.H22 | FHP900.H13 | 3.789 | 0.00033795 |
| FHP900.H25 | FHP900.H13 | 4.051 | 0.00022627 |
| FHP900.H6 | FHP900.H13 | 4.759 | 8.60807E-05 |
| ARG266.HD2 | FHP900.H14 | 4.225 | 0.000175808 |
| ARG266.HD3 | FHP900.H14 | 4.664 | 9.71513E-05 |
| ARG266.HH11 | FHP900.H14 | 2.698 | 0.002592676 |
| ARG266.HH12 | FHP900.H14 | 2.755 | 0.002287022 |
| ARG266.HH22 | FHP900.H14 | 4.316 | 0.000154708 |
| FHP900.H12 | FHP900.H14 | 3.512 | 0.000532933 |
| FHP900.H17 | FHP900.H14 | 2.562 | 0.003536106 |
| FHP900.H2 | FHP900.H14 | 6.184 | 1.78806E-05 |
| LEU530.HD22 | FHP900.H14 | 2.372 | 0.00561451 |
| LEU530.HG | FHP900.H14 | 4.033 | 0.000232397 |
| LYS531.H | FHP900.H14 | 4.004 | 0.000242681 |
| LYS531.HB2 | FHP900.H14 | 4.258 | 0.00016779 |
| FHP900.H11 | FHP900.H15 | 4.594 | 0.000106379 |
| FHP900.H12 | FHP900.H15 | 2.336 | 0.006154078 |
| FHP900.H7 | FHP900.H15 | 3.487 | 0.000556273 |
| FHP900.H8 | FHP900.H15 | 4.874 | 7.45911E-05 |
| ILE523.HD13 | FHP900.H15 | 4.414 | 0.000135209 |
| LEU530.H | FHP900.H15 | 4.135 | 0.000200054 |
| LEU530.HB2 | FHP900.H15 | 3.203 | 0.000926101 |
| LEU530.HB3 | FHP900.H15 | 2.438 | 0.004762092 |
| TRP275.HH2 | FHP900.H15 | 4.44 | 0.000130528 |
| TRP275.HZ3 | FHP900.H15 | 3.54 | 0.000508137 |
| TYR524.HE1 | FHP900.H15 | 3.79 | 0.000337415 |
| TYR524.HH | FHP900.H15 | 2.583 | 0.003367081 |

10.6 Skripte, die im Programm R verwendet wurden

Die hier aufgelisteten Skripte wurden von Nils Diedrich programmiert und für die Auswertung der Kinetik-Experimente zur Verfügung gestellt.

```
lin9 <- function(S, t, S0)
{
  ## Koordinatentransformation
  x      <- (S0-S)/log(S0/S)
  y      <- t/log(S0/S)

  ## Lösung des linearen Minimierungsproblems
  fit    <- lm(y~x)

  ## Berechnung von Vm und Km
  Vm     <- (1/fit$coefficients[[2]])
  Km     <- (Vm*fit$coefficients[[1]])

  ## Ausgabe der Parameterliste
  list(Vm = Vm, Km = Km)
}

lin11 <- function(S, t, S0)
{
  ## Koordinatentransformation
  x      <- t/(S0-S)
  y      <- log(S0/S)/log(S0-S)

  ## Lösung des linearen Minimierungsproblems
  fit    <- lm(y~x)

  ## Berechnung von Vm und Km
  Vm     <- (1/fit$coefficients[[2]])
  Km     <- (Vm*fit$coefficients[[1]])

  ## Ausgabe der Parameterliste
  list(Vm = Vm, Km = Km)
}

lambertW <- function(z,b=0,maxiter=40,eps=.Machine$double.eps,
min.imag=1e-9)
{
  if (any(round(Re(b)) != b))
    stop("branch number for W must be an integer")
  if (!is.complex(z) && any(z<0)) z=as.complex(z)
  w = (1 - 2*abs(b))*sqrt(2*exp(1)*z + 2) - 1
  v = log(z + as.numeric(z==0 & b==0)) + 2*pi*b*1i;
  v = v - log(v + as.numeric(v==0))
  c = abs(z + exp(-1));
  c = (c > 1.45 - 1.1*abs(b));
  c = c | (b*Im(z) > 0) | (!Im(z) & (b == 1))
  w = (1 - c)*w + c*v
  for (n in 1:maxiter) {
    p = exp(w)
```

```

        t = w*p - z
        f = (w != -1)
        t = f*t/(p*(w + f) - 0.5*(w + 2.0)*t/(w + f))
        w = w - t
        if (abs(Re(t)) < (2.48*eps)*(1.0 + abs(Re(w)))
            && abs(Im(t)) < (2.48*eps)*(1.0 + abs(Im(w))))
            break
        }
    if (n==maxiter) warning(paste("iteration limit (",maxiter,
        ") reached, result of W may be inaccurate",sep=""))
    if (all(Im(w)<min.imag)) w = as.numeric(w)
    return(w)
}

substrate <- function(par,t,S0) {
    par$Km*lambertW((S0/par$Km)*exp((S0-(par$Vm*t))/par$Km))
}

residuum <- function(par,observed,t,S0) {
    observed-substrate(par,t,S0)
}

zeichnen <- function(t, S, S0, lin)
{
    plot.new()

    # Zeichnen der Messdaten
    plot(t, S, col="black")

    # Zeichnen der gefitteten Funktionen
    lines(t, substrate(as.list(coef(nls.lm(
        par=lin(S, t, S0), fn=residuum, observed=S, t=t, S0=S0,
        control=nls.lm.control(ftol=1e-15, nprint=1, maxiter=10000))),
        t, S0), lwd=3, col="red")
    as.list(coef(nls.lm( par=lin(S, t, S0), fn=residuum, observed=S,
        t=t, S0=S0, control=nls.lm.control(ftol=1e-15,maxiter=10000))))
}

plotdiff <- function(t, S, S0)
{
    plot.new()

    # Zeichnen der Messdaten
    plot(t,S,col="black")

    # Berechnung der rechten Nachbarwerte
    N <- c(S0,S[1:(length(S)-1)])
    T <- c(0,t[1:(length(t)-1)])

    # Berechnung der Differentiale
    dt <- T-t
    dS <- N-S
    D <- -dS/dt

    # Zeichnen der Differentialkurve
    plot(S,D)

    # Residuumsfunktion
    resi <- function(par,S){

```

```
      D-((par$Vm*S)/(par$Km+S))
    }

# Bestimmung der Parameter
x <- as.list(coef(nls.lm(par=list(Vm=0.01, Km=0.01),
  fn=resi, S=S, control=nls.lm.control(nprint=1, ftol=1e-15,
  maxiter=100))))
lines(S, (x$Vm*S)/(x$Km+S), lwd=3, col="red")
return(x)
}
```

10.7 Gefahrstoffanhang

| Substanzname | Gefahrensymbol | R-Sätze | S-Sätze |
|--|-----------------------------------|----------------------------|------------------------|
| Aceton | F | 11 | 9-16-23.2-33 |
| Acetonitril (MeCN) | F, T | 11-23/24/25 | 16-27-45 |
| <i>O</i> -(Benzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluroniumtetrafluoro-borat (TBTU) | Xi | 36/37/38 | 26-36 |
| <i>tert</i> -Butylmethylether | F | 11-66 | 16-23.2-29-33 |
| Calciumchlorid | Xi | 36 | 22-24 |
| 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) | - | - | 24/25 |
| <i>N,N</i> -Diisopropylethylamin (DIPEA) | F, C | 11-22-34-52/53 | 16-26-36/37/39-45-61 |
| <i>N</i> -(3-Dimethylaminopropyl)- <i>N</i> -ethylcarbodiimidhydrochlorid (EDC) | Xn | 22-36/37/38-42 | - |
| <i>N,N</i> -Dimethylformamid (DMF) | T | 61-E20/21-36 | 53-45 |
| 1,4-Dithiothreitol (DTT) | Xn | 22-36/38 | - |
| Essigsäure | C | 10-35 | 23.2-26-36/37/39-45 |
| Essigsäureanhydrid (Ac ₂ O) | C | 10-20/22-34 | 26-36/37/39-45 |
| Ethanol | F | 11 | 7-16 |
| Ethanolamin | Xn | 20-36/37/38 | - |
| Ethylenglycol | Xn | 22 | |
| Fmoc-Aminosäurederivate | nicht vollständig geprüfter Stoff | | |
| Farnesyldiphosphat (in Methanol: 10 mM wässrige NH ₄ OH - 7:3) | F,T | 11-23/24/25-39/23/24/25 | 7-16-36/37-45 |
| [1(n)- ³ H]-Farnesyldiphosphat (in Ethanol: 100 mM wässrige NH ₄ HCO ₃ - 1:1) | Xi, R | 10-36/37/38 | 16-26-36 |
| Farnesylmonophosphat (in Methanol: 10 mM wässrige NH ₄ OH - 7:3) | F,T | 11-23/24/25-39/23/24/25 | 7-16-36/37-45 |
| Fmoc-PAL-PEG-PS-Harz | nicht vollständig geprüfter Stoff | | |
| <i>n</i> -Hexane | Xn, F, N | 11-38-48/20-51/53-62-65-67 | 9-16-29-33-36/37-61-62 |
| <i>N</i> -Hydroxysuccinimid (NHS) | Xi | 5-36/37/38 | - |

| | | | |
|--|------------------------|-----------------------------|------------------------|
| Imidazole | C | 22-34 | 22-26- 36/37/39-45 |
| Isopropylthiogalactosid (IPTG) | - | - | 22-24/25 |
| Kaliumchlorid | - | - | - |
| Magnesium(II)chlorid | - | - | 22-24/25 |
| Methanol | F, T | 11-23/24/25- 39/23/24/25 | 7-16-36/37- 45 |
| 3- <i>N</i> -(Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS) | Xn | 36/37/38 | 26-36 |
| Natriumazid | T ⁺ , N | 28-32-50/53 | 28.1-45-60- 61 |
| Natriumchlorid | - | - | - |
| Natriumdihydrogenphosphat | - | - | - |
| di-Natriumhydrogenphosphat Monohydrat | - | - | - |
| Ni-NTA-Agarose | Xn | 10-22-40-42/43 | 13-26-36-46 |
| <i>n</i> -Pentan | Xn, F ⁺ , N | 12-51/53-65- 66-67 | 9-16-29-33- 61-62 |
| Phenylmethylsulfonylfluorid | T, C | 25-34 | 26-36/37/39- 45 |
| Piperidin | F, T | 11-23/24-34 | 16-26-27-45 |
| 2-Propanol | F, Xi | 11-36-67 | (2-)7-16- 24/25-26 |
| Salzsäure | C | 34-37 | 26-36/37/39- 45 |
| Trifluoressigsäure (TFA) | C | 20-35-52/53 | 9-26-27-28.1- 45-61 |
| Trifluorethanol (TFE) | Xn | 10-20/21/22- 37/38-41 | 26-36-39 |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) | Xi | 36/38 | - |
| Triisopropylsilan (TIPS) | Xi | 10-36/37/38 | 26-36 |
| Zink(II)chlorid | C | 34 | 7/8-28.1-45 |

LEBENS LAUF

Name: Thomas Hackl

Geburtsdatum: 04.05.1974

Geburtsort: Bad Segeberg

AUSBILDUNG

- 08/1980-07/1984 Grundschule Knauerstraße (Hamburg)
- 08/1984-05/1994 Gymnasium Eppendorf (Hamburg)
Abitur
- 10/1994-01/2004 Chemiestudium (Diplom) an der Universität Hamburg
Vordiplomprüfung: 10.06.1997
Diplomprüfung: 09.01.2004
- 04/2003-01/2004 Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie der Universität
Hamburg unter Betreuung von Prof. Dr. Wilfried A. König
(† 19.11.2004)
*Titel: Isolierung und Strukturaufklärung von sekundären Naturstoffen
aus den Lebermoosen *Plagiochila bifaria* und *Saccogyna viticulosa*
und deren stereochemische Untersuchung*
- 03/2004-09/2004 Beginn der Promotion am Institut für Organische Chemie der
Universität Hamburg unter Betreuung von Prof. Dr. Wilfried A. König
(† 19.11.2004)
- Seit 10/2004 Weiterführung der Promotion am Institut für Organische Chemie der
Universität Hamburg unter Betreuung von Prof. Dr. Bernd Meyer
*Titel: Untersuchung von hydrophoben Protein-Ligand-
Wechselwirkungen in wässriger Lösung mittels Saturation Transfer
Difference NMR am Beispiel der Enzymreaktion der (+)-Germacren D
Synthase*

AUSLANDSPRAKTIKUM

- 12/1998-05/1999 Forschungsinstitut CSIC (Consejo Superior de Investigaciones
Científicas), Sevilla, Spanien (Erasmus-Sokrates-Programm)
*Thema: Synthese und Charakterisierung binuclearer Nickel- und
Palladiumkomplexe mit verbrückenden Aryloxyliganden*

ANSTELLUNGSVERHÄLTNISSE UND LEHRTÄTIGKEITEN

- 01/2003-09/2003 Lehrtätigkeit im Praktikum Chemie für Medizin-Studenten (Universität
Hamburg)
- 07/2004 Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter (Universität Hamburg)

| | |
|-----------------|---|
| 02/2005-06/2008 | Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter (Universität Hamburg) |
| 07/2006 | Organisation und Leitung des Kurses „Naturstoffe und Medikamente“ im Rahmen der Deutschen Schülerakademie (Rostock) |
| 10/2006-04/2007 | Lehrtätigkeiten im Grundpraktikum der Organischen Chemie für Chemie-Studenten (Universität Hamburg) |
| Seit 11/2008 | Anstellung als wissenschaftlicher Mitarbeiter (Universität Hannover), Leitung der NMR-spektroskopischen Abteilung |

WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

ARTIKEL IN FACHZEITSCHRIFTEN

Hackl, T., Koenig, W. A., Muhle, H. (2006), *Phytochemistry*, 67, 778-783.
Three ent-eudesmenones from the liverwort Plagiochila bifaria.

Elfahmi, Batterman, S., Koulman, A., Hackl, T., Bos, R., Kayser, O., Woerdenbag, H. J., Quax, W. J. (2006), *Journal of Natural Products*, 69, 55-58.
Lignans from Cell Suspension Cultures of Phyllanthus niruri, an Indonesian Medicinal Plant.

Hackl, T., Koenig, W. A., Muhle, H. (2004), *Phytochemistry*, 65, 2261-2275.
Isogermacrene A, a proposed intermediate in sesquiterpene biosynthesis.

Campora, J., Reyes, M. L., Hackl, T., Monge, A., Ruiz, C. (2000), *Organometallics*, 19, 2950-2952.
Synthesis of π -Aryloxide Complexes of Nickel and Palladium.

POSTERPRÄSENTATIONEN

Hackl, T., Fransson, I. G., Schaefer, K., Fellenberg, M., Meyer, B. (2007), Euromar – Magnetic Resonance Conference, Tarragona, Spain, July 1st-6th.
NMR Spectroscopic Characterization of Protein Interaction with Hydrophobic Ligands in Aqueous Solution.

Hackl, T., König, W. A., Muhle, H. (2004), Future Trends in Phytochemistry: International Young Scientists' Meeting of the Phytochemical Society of Europe, Gargnano, Italy, May 5th-8th.
Isogermacrene A, a proposed intermediate in sesquiterpene biosynthesis.

Hackl, T., König, W. A., Muhle, H. (2003), ISEO – 33rd International Symposium of Essential Oils, Würzburg, Germany, September 4th-7th.
Three ent-eudesmenones from the liverwort Plagiochila bifaria.

MEIN DANK GILT

Anna-Winona Struck für die wundervollen vergangenen zwei Jahre, für Ihre Liebe und Unterstützung.

Meinem Bruder André für alles was wir gemeinsam durchgestanden haben.

Mike M. K. Boysen für die vielen Jahre, die wir irgendwie immer gemeinsam gegangen sind und manch schönen Abend.

Meinen Freunden Jörg Weißenhorn, Olaf Zastrow und Sofien Sidhoum für viele gemeinsame Erlebnisse und den nötigen Ausgleich im Leben neben der Uni.

Karoll Milene Egea Egea für Ihre Partnerschaft in einem wichtigen Lebensabschnitt und Ihre Freundschaft.

Birgit Claasen für die tolle Zeit in Sevilla und viele weitere unvergessene Erlebnisse. In Spanien wurde das gemeinsame Interesse für die NMR-Spektroskopie geweckt. Es ist schön zu wissen, dass wir uns noch viele Male über den Weg laufen werden.

Gudrun und Klaus für Ihre herzliche Aufnahme im Hause Struck, die einem das Gefühl gibt eine neue Familie gefunden zu haben.

Meinen Kommilitonen der ersten Stunde, Stephan H. von Reuß und Robert Twele, für viele schöne Erinnerungen an die Studienzeit.

Volker Sinnwell für seine Unterstützung, auch über den Rahmen dieser Arbeit hinaus. Weiterhin danke ich Ihm für seine stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und dass er die Entstehung und den Verlauf des NMR-Seminars so tatkräftig unterstützt hat.

Dr. Iris Fransson für die Überlassung des Themas, die Plasmide der Germacren D Synthesen und für die Einführung in die biochemischen Arbeitsweisen.

Meinem Mentor während der Diplomarbeit, Prof. Dr. Wilfried A. König, für die Überlassung des Themas.

Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Wittko Franke für die Unterstützung und Betreuung während der Krankheitsphase von Prof. Dr. W. A. König sowie für die Durchsicht des Manuskriptes über die Inhaltsstoffe von *Plagiochila bifaria*.

Prof. Dr. Ulrich Hahn für die Möglichkeit, die biochemischen Arbeiten in seinen Laboratorien durchzuführen. Ich danke allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen von Prof. Dr. U. Hahn und Prof. Dr. R. Bredehorst für vielfältige Hilfen, Tipps und Tricks. Mein besonderer Dank gilt Edzard Spillner, Sabine Kainz und Thorsten Mix.

Meinen Schwerpunktspraktikanten Katrin Schaefer, Meike Fellenberg und Henning Behnken für Ihren Beitrag zu dieser Arbeit und fürs Korrekturlesen. Für das Korrekturlesen danke ich außerdem Anna-Winona Struck und Mike M. K. Boysen.

Marco Axmann, Atilla Çoksezen, Michael Goldflam, Martin Hollinger, Kolja Klein, Mirko Lindner, Dirk Rehders, Dennis Wilhelm für wissenschaftliche Gespräche und vieles mehr.

Ilona Grüneberg für die schöne Zeit in der 17a und die netten Kochabende.

Dem Team „Ein NMR für alle Fälle“ für die tolle Zusammenarbeit, vor allem: Marco Axmann, Birgit Claasen, Atilla Çoksezen, Kolja Klein, Dirk Rehders und Meike Fellenberg. Weiterhin danke ich der IT-Abteilung der Universität Hamburg für ihren Support.

Allen Mitgliedern und Ehemaligen des AKBM für die schöne Zeit: Joachim Albers, Kathrin Althof, Michael Bartels, Henning Behnken, Karolina Elsholz, Meike Fellenberg, Lars Fischer, Christian Flügge, Britta Hünnefeld, Robin Job, Beatrice Jürs, Miriam Kötzler, Boris Kröplien, Thomas Kühnemund, Vera Leitmann, Caroline Reibe, Katrin Schaefer, Svenja Scheid, So-Young Shin, Winrich Scherres, Jutta Tost, Moriz Waldmann, Katharina Wallach, Jan-Christoph Westermann und Martin Wienke.

Der Firma *R. C. Treatt* danke ich für die Spende einer Forschungsprobe an (-)-Germacren D.

ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich des Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Ich versichere weiterhin, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in veränderter Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Thomas Hackl

Hamburg, den 17. April 2009