

Chapter 10

Zusammenfassung

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden mehrere Gesamtlängen-cDNAs und cDNA-Fragmente von Sesquiterpensynthasen aus der Pflanze *Solidago canadensis* isoliert. Die Isolierung erfolgte durch Screening einer λ -Phage cDNA-Bibliothek mit einer Sonde aus cDNA-Fragmente, die mittels PCR degenerierter Primer erzeugt wurden. Zusätzlich wurden Gesamtlängensequenzen mit Hilfe der RACE-PCR-Technik ermittelt. Vier der isolierten Gesamtlängen-cDNAs konnten funktional in *E. coli* heterolog exprimiert werden. Die Identifizierung der exprimierten Sesquiterpensynthasen erfolgte nach Inkubation mit dem Substrat Farnesyldiphosphat über die Identifizierung der katalytisch erzeugten Produkte. Die Produktidentifizierung wurde zum einen massenspektrometrisch und zum anderen durch gaschromatographische Untersuchungen an enantioselektiver stationärer Phase durchgeführt. Die Benennung der Sesquiterpensynthasen erfolgte nach dem katalytisch erzeugten Hauptprodukt. Es wurden folgende vier Sesquiterpensynthasen identifiziert:

- (+)-Germacren D-Synthase ((+)GDS) mit (+)-Germacren D als Hauptprodukt (90%) und einigen nicht identifizierten Nebenprodukten.

- (-)-Germacren D Synthase ((-)-GDS) mit (-)-Germacren D als Hauptprodukt (90%) und einigen nicht identifizierten Nebenprodukten.
- α -Gurjunen-Synthase (α GS) mit dem Hauptprodukt α -Gurjunen (81.3%) und den zwei Nebenprodukten γ -Gurjunen (8.8%) sowie Bicyclogermacren (7.1%).
- Cascarilladien-Synthase mit dem Hauptprodukt Cascarilladien (77.3%) und dem Nebenprodukt δ -Selinen (14.5%).

Mit den zwei Germacren D-Synthasen wurden die Enzyme isoliert, welche für die Erzeugung der Sesquiterpen-Hauptkomponente (+)- und (-)-Germacren D von *Solidago canadensis* verantwortlich sind. α -Gurjunen ist die Sesquiterpenzwischenstufe für die Biosynthese von Cyclocoloronon, ebenfalls einer der Hauptkomponenten des ätherischen Öls von *Solidago canadensis*. Cascarilladien dagegen ist ein Nebenprodukt, dessen Existenz zuvor in *Solidago canadensis* unbekannt war und das erst kürzlich in der Terpenfraktion nachgewiesen werden konnte.

Das pH-Optimum und die kinetischen Daten der Enzyme wurden für alle vier heterolog exprimierten Sesquiterpensynthasen ermittelt. Das pH-Optimum der Enzyme lag bei pH = 7.5, für die Michaelis-Menten Konstante K_M wurden Werte zwischen 6 und 16 μ M gefunden. Diese Werte liegen im Bereich der Werte, die auch für andere Sesquiterpensynthasen ermittelt worden sind.

In dieser Arbeit wurden zum erstenmal die codierenden Gesamtlängensequenzen zweier Sesquiterpensynthasen aus einem Organismus isoliert, die jeweils die Biosynthese der beiden Enantiomere desselben Sesquiterpens, in diesem Fall Germacren D, katalysieren.

Zudem ergab sich durch die hohe Sequenzhomologie mit einer Aminosäuresequenzidentität von 85% die Möglichkeit, die Aminosäuren der Aktivzentren der Enzyme zu ermitteln, die vermutlich für die Enantiospezifität der Synthasen verantwortlich sind. Hierzu wurde die Methode der homologen Modellierung der räum-

lichen Struktur der Synthesen im Vergleich zu der bekannten räumlichen Struktur der Sesquiterpensynthese *epi*-Aristolochensynthese verwendet. Zusätzlich wurden Docking-Experimente mit dem ersten kationischen Zwischenprodukt, das für beide Germacren D-Enantiomere identisch ist, mit dem Aktivzentrum durchgeführt. Hierdurch konnten fünf Aminosäurereste ermittelt werden, die vermutlich für die enantiospezifische Katalyse der Germacren D-Synthesen verantwortlich sind.

Die Isolierung der enantiospezifischen (+)GDS und (-)GDS in Verbindung mit der erfolgreichen heterologen Expression in *E. coli* eröffnet weiterhin die Möglichkeit, die Enzyme in ausreichender Menge für Röntgenstrukturanalysen herzustellen. Durch die Aufklärung der 3-dimensionalen Struktur könnten die enantiospezifisch fungierenden Aktivzentren der Enzyme detailliert untersucht und der Mechanismus der enantiospezifisch ablaufenden Katalyse aufgeklärt werden.

Außerdem wurde durch die Identifizierung der (+)GDS, (-)GDS und α GS drei weitere Synthesen isoliert, die zusammen mit der schon bekannten Germacren A-Synthase eine Gruppe von vier verschiedenen Sesquiterpensynthesen in *Solidago canadensis* bilden, die alle untereinander eine Sequenzidentität über 84% besitzen. Dies zeigt, dass schon ca. 10%-15% an Sequenzunterschieden zur Veränderung der Produktspezifität der Sesquiterpensynthesen ausreichen.