

**Biosynthese der Sesquiterpene  
(+)-Germacren D, (-)-Germacren D  
und (-)- $\alpha$ -Gurjunen in  
*Solidago canadensis***

-

**Enzymisolierungen und  
Aufklärung der Bildungsmechanismen**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Chemie der  
Universität Hamburg

vorgelegt von

**Claus Oliver Schmidt**

aus Hamburg

Hamburg 1998

1. Gutachter: Prof. Dr. W.A. König
2. Gutachter: Prof. Dr. J. Thiem

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 17. Dezember 1998

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1996 bis Dezember 1998 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. W.A. König (Universität Hamburg) erstellt. Die Durchführung der Arbeiten erfolgte zum einem am Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg unter der Leitung von Prof. Dr. W.A. König und zum anderen an dem Research Institute for Agrobiolology and Soil Fertility (AB-DLO, Wageningen) des Agricultural Research Department der Niederlande unter der Leitung von Dr. H.J. Bouwmeester.

Herrn Prof. Dr. W.A. König danke ich für die interessante Themenstellung, für die Ermöglichung einer Kooperation zwischen der Universität Hamburg und dem AB-DLO-Institut Wageningen (NL), sowie seinem fortwährenden Interesse am Verlauf der Arbeit. I would like to thank Dr. H.J. Bouwmeester for his advise and support of this project and for his continuous interest in this cooperation.

*Für meine Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	SESQUITERPENE.....	1
1.2	CHIRALITÄT.....	2
1.3	BIOSYNTHESE VON SESQUITERPENEN .....	5
<b>2</b>	<b>PROBLEMSTELLUNG</b> .....	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>ALLGEMEINER TEIL</b> .....	<b>11</b>
3.1	SESQUITERPENANALYTIK.....	11
3.1.1	Ätherische Öle .....	11
3.1.2	Strukturaufklärung von Sesquiterpenen.....	12
3.1.3	Enantiomerenanalytik von Sesquiterpenen.....	14
3.2	GRUNDLAGEN DER BIOSYNTHESE VON SESQUITERPENEN .....	17
3.2.1	Biosynthese von Isopentenylidiphosphat (IDP) .....	17
3.2.2	Biosynthese von ( <i>E,E</i> )-Farnesylidiphosphat (FDP) .....	20
3.2.3	Sesquiterpen-Synthasen.....	21
3.2.4	Ziel der Sesquiterpen-Biosynthese.....	28
3.3	METHODEN DER ENZYMISOLIERUNG.....	31
3.4	MOLEKULARBIOLOGIE DER SESQUITERPEN-SYNTHASEN .....	34
<b>4</b>	<b>SPEZIELLER TEIL</b> .....	<b>35</b>
4.1	ÜBERBLICK.....	35
4.2	DIE PFLANZE <i>SOLIDAGO CANADENSIS</i> UND IHRE INHALTSSTOFFE .....	35
4.3	ENZYMISOLIERUNGEN.....	39
4.3.1	Radiochemische Assays und Radio-Gaschromatographie.....	39
4.3.2	Isolierung von (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase.....	44
4.3.3	Ein alternativer Weg zur Isolierung von (+)-Germacren-D-Synthase.....	53
4.3.4	Isolierung von (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase .....	57
4.4	BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DER SYNTHASEN.....	65
4.4.1	Bestimmung der molaren Masse .....	65
4.4.1.1	Gelelektrophorese .....	66
4.4.1.2	Gelfiltration .....	69
4.4.2	Kinetische Studien .....	72
4.4.2.1	Linearitätsexperimente .....	72
4.4.2.2	Michaelis-Menten Kinetik der Synthasen.....	74
4.4.3	pH-Optimum .....	79
4.5	SYNTHESE VON DEUTERIERTEN FARNESYLDIPHOSPHATEN .....	82
4.5.1	Synthese von ( <i>IR</i> )-[1- <sup>2</sup> H]-FDP .....	84
4.5.2	Synthese von ( <i>IS</i> )-[1- <sup>2</sup> H]-FDP .....	87
4.5.3	Synthese von [1,1- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-FDP .....	88
4.5.4	Synthese von [10- <sup>2</sup> H]-FDP.....	89
4.6	AUFKLÄRUNG DER CYCLISIERUNGSMECHANISMEN .....	91
4.6.1	Linked Scan-Massenspektrometrie .....	94
4.6.2	Cyclisierungsmechanismus von (-)-Germacren-D-Synthase.....	95
4.6.3	Cyclisierungsmechanismus von (+)-Germacren-D-Synthase .....	102
4.6.4	Cyclisierungsmechanismus von (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase .....	107
4.7	AUSBLICK: VERBLEIB VON (-)- $\alpha$ -GURJUNEN IN <i>S. CANADENSIS</i> .....	114
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>119</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>121</b>

<b>7</b>	<b>EXPERIMENTELLER TEIL</b>	<b>123</b>
7.1	GERÄTE UND REAGENZIEN	123
7.2	CHEMISCHER TEIL	127
7.2.1	Isolierung von (+)- und (-)-Germacren D	128
7.2.2	( <i>E,E</i> )-Farnesal (2)	128
7.2.3	( <i>E,E</i> )-( <i>IR</i> )-[1- <sup>2</sup> H]-Farnesol (3)	129
7.2.4	Bis-(triethylammonium)- <i>ortho</i> -phosphat	130
7.2.5	( <i>E,E</i> )-( <i>IR</i> )-[1- <sup>2</sup> H]-Farnesyldiphosphat (4)	130
7.2.6	[1- <sup>2</sup> H]-Cyclohex-2-en-1-ol (5)	131
7.2.7	( <i>E,E</i> )-( <i>IRS</i> )-[1- <sup>2</sup> H]-Farnesol (7)	132
7.2.8	( <i>E,E</i> )-[1- <sup>2</sup> H]-Farnesal (8)	132
7.2.9	( <i>E,E</i> )-( <i>IS</i> )-[1- <sup>2</sup> H]-Farnesol (9)	133
7.2.10	( <i>E,E</i> )-( <i>IS</i> )-[1- <sup>2</sup> H]-Farnesyldiphosphat (10)	133
7.2.11	( <i>E,E</i> )-[1,1- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Farnesol (11)	133
7.2.12	( <i>E,E</i> )-[1,1- <sup>2</sup> H <sub>2</sub> ]-Farnesyldiphosphat (12)	134
7.2.13	( <i>E,E</i> )-Farnesylacetat (13)	135
7.2.14	( <i>E,E</i> )-10,11-Epoxy-farnesylacetat (14)	135
7.2.15	( <i>E,E</i> )-10,11-Dihydroxy-farnesylacetat (15)	136
7.2.16	Farnesylacetatrinoraldehyd (16)	137
7.2.17	( <i>IRS</i> )-[1- <sup>2</sup> H]-10-Acetoxy-4,8-dimethyldeca-4,8-dien-1-ol (17)	137
7.2.18	[10- <sup>2</sup> H]-Farnesylacetatrinoraldehyd (18)	138
7.2.19	( <i>E,E</i> )-[10- <sup>2</sup> H]-Farnesol (19)	138
7.2.20	( <i>E,E</i> )-[10- <sup>2</sup> H]-Farnesyldiphosphat (20)	139
7.3	BIOCHEMISCHER TEIL	140
7.3.1	Verwendete Puffer	140
7.3.2	Enzymrohextrakt	140
7.3.3	DEAE-Anionenaustauscher-Chromatographie	141
7.3.4	AMS-Präzipitation	141
7.3.5	Dye-Liganden-Test-Kit	142
7.3.6	Dye Red 120-Chromatographie	142
7.3.7	Hydroxylapatit-Chromatographie (FPLC)	142
7.3.8	MonoQ-Chromatographie (FPLC)	143
7.3.9	Gelfiltration (FPLC)	143
7.3.10	Microassay	144
7.3.11	Macroassay I (Radioassay)	144
7.3.12	Macroassay II (Deuteriumassay)	145
7.3.13	Oxidationsexperiment	145
7.3.14	Bestimmung der linearen Produktbildung	146
7.3.15	Bestimmung der K <sub>M</sub> -Werte	146
7.3.16	Bestimmung des pH-Optimums	146
<b>8</b>	<b>ANHANG: MEBERGEBNISSE DER MICROASSAYS</b>	<b>147</b>
<b>9</b>	<b>GEFAHRSTOFFANHANG</b>	<b>149</b>
<b>10</b>	<b>PUBLIKATIONEN UND PRÄSENTATIONEN</b>	<b>151</b>
<b>11</b>	<b>INDEX</b>	<b>153</b>
<b>12</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>157</b>

## Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AMS	Ammoniumsulfat
amu	atomic mass unit
CD	Cyclodextrin
Conc.	Konzentration
COSY	Correlated Spectroscopy
cps	counts per second
d	Dublett
d.Th.	der Theorie
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dpm	Disintegrations per minute
DTT	Dithiothreitol
EI	Elektronenstoßionisation
eV	Elektronenvolt
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
FDP	Farnesylidiphosphat
FID	Flame-Ionization-Detection
FMN	Riboflavin-5'-phosphat Mononatriumsalz
FPLC	Fast-Protein-Liquid-Chromatography
g	Gravitationskonstante
GC	Gaschromatographie
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
h	Stunden
HIC	Hydrophobic-Interaction-Chromatography
HLADH	Horse-Liver-Alcohol-Dehydrogenase
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
IDP	Isopentenylidiphosphat
J	Kopplungskonstante
$K_M$	Michaelis-Menten-Konstante
m	Multipllett
M	molare Konzentration in mol L <sup>-1</sup>
m/z	Massenzahl (Masse pro Ladung)
Me	Methyl
Mes	2-Morpholinoethansulfonsäure
min	Minuten
Mopso	3-[N-Morpholino]-2-hydroxy-propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Dihydronicotinamid-adenin-dinucleotid
NMR	Kernresonanzspektroskopie
Pe	Pentyl
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfate-Polyacrylamide-Gelelectrophoresis
SFC	Supercritical-Fluid-Chromatography
T	<i>tert</i> -Butyldimethylsilyl
t	Triplett
Tab.	Tabelle
<i>tert</i>	tertiär
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett
v/v	Volumenverhältnis bezogen auf Volumen



# 1 Einleitung

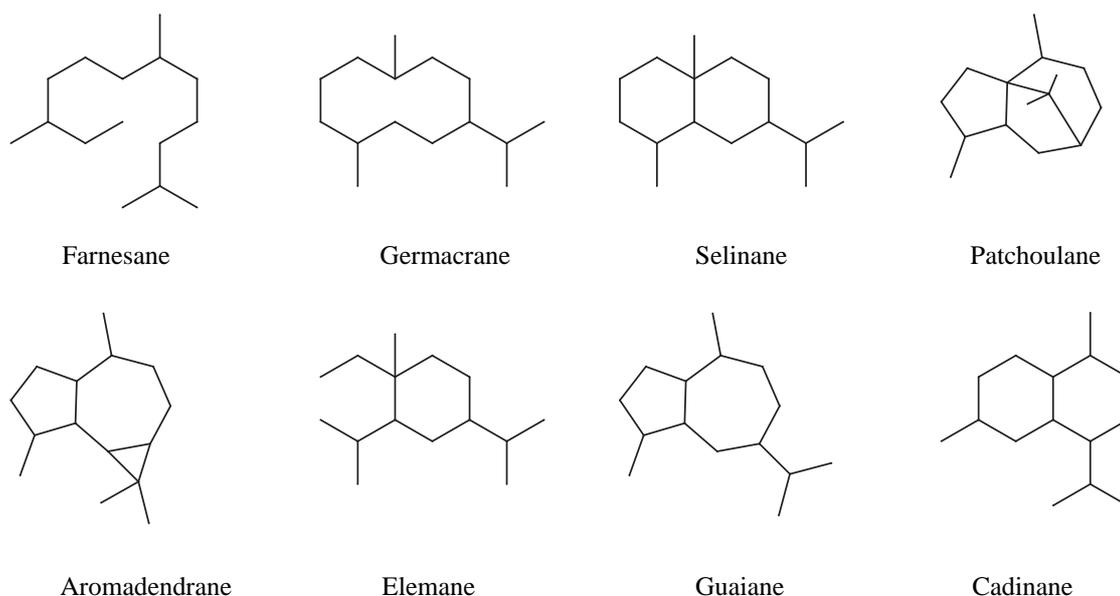
## 1.1 Sesquiterpene

Sesquiterpene<sup>[1]</sup> gehören zu den terpenoiden Naturstoffen. Terpene werden nach der sog. Isoprenregel eingeteilt, die jedoch nicht streng gilt. Je nach Anzahl der Isopreneinheiten (bzw. Anzahl der Kohlenstoffatome) unterscheidet man zwischen folgenden Terpenen:

- C<sub>10</sub>: Monoterpene
- C<sub>15</sub>: Sesquiterpene
- C<sub>20</sub>: Diterpene
- C<sub>25</sub>: Sesterterpene
- C<sub>30</sub>: Triterpene

Innerhalb der Terpene bilden die Sesquiterpene die größte Gruppe. Bis heute wurden tausende verschiedener Sesquiterpene mit verschiedensten Grundgerüsten isoliert. Eine Vielzahl unterschiedlicher Organismen ist in der Lage Sesquiterpene zu synthetisieren. Sesquiterpene konnten u.a. schon aus Pilzen<sup>[2]</sup>, Moosen<sup>[3]</sup>, höheren Pflanzen<sup>[4]</sup>, und marinen Organismen<sup>[5]</sup> isoliert werden.

Sesquiterpene besitzen acyclische, mono-, bi-, tri- und oligocyclische Grundgerüste (Abb. 1).



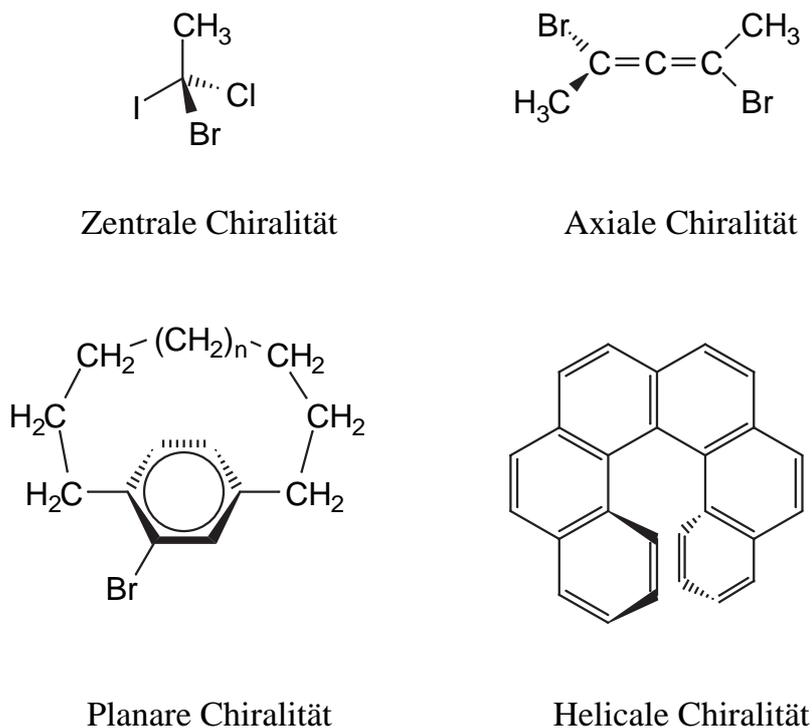
**Abb. 1** Auswahl von Grundgerüsten verschiedener Sesquiterpene.

Sesquiterpene werden aus Pflanzen durch Wasserdampfdestillation oder durch Extraktion mit organischen Lösungsmitteln gewonnen. Die erhaltenen „ätherischen“ Öle dienen als Ausgangsbasis für die Isolierung einzelner Komponenten. Die Separation der Sesquiterpene aus einem ätherischen Öl kann durch verschiedenste Chromatographie-Techniken erreicht werden (präparative Gaschromatographie, HPLC, Kieselgel-Chromatographie, SFC, Dünnschicht-Chromatographie etc.). Eine Strukturanalyse der isolierten Verbindungen erfolgt hauptsächlich mittels massenspektrometrischen Techniken und NMR-spektroskopischen Methoden. Oftmals kann eine neue Struktur nur durch chemische Synthese der vermuteten Verbindung eindeutig bewiesen werden. Dies ist häufig der Fall, wenn die absolute Konfiguration der Verbindung nicht mit spektroskopischen Mitteln bestimmt werden kann.

Die Bedeutung der Sesquiterpene, die zu den Sekundärmetaboliten von Organismen gehören, ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Sekundärmetabolite werden heute längst nicht mehr nur als „Abfallprodukte“ des Stoffwechsels angesehen, vielmehr wird ihnen eine große Bedeutung als Botenstoffe zuerkannt. Es wurde nachgewiesen, daß Sesquiterpenkohlenwasserstoffe und ihre oxigenierten Folgeprodukte (Sesquiterpenalkohole, -ketone, -säuren, -ester und -ether) als Antwort auf Schädlings- und Pilzbefall von Pflanzen synthetisiert werden<sup>[6]</sup>. Fernerhin spielen Sesquiterpene eine Rolle als Pheromone<sup>[7]</sup> und können dabei auch als Insektenabwehrstoffe agieren<sup>[8]</sup>. Sesquiterpenlactone wie Pentalenonlacton<sup>[9]</sup> werden kommerziell als Antibiotika eingesetzt. In der Parfum- und Duftstoff-Industrie finden Sesquiterpene ebenfalls ein weites Anwendungsgebiet. Zum einen werden sie als Fixierungskomponenten in Parfums genutzt und zum anderen als „character impact compounds“, d.h. als Stoffe, die ein charakteristisches Aroma prägen<sup>[10]</sup>.

## 1.2 Chiralität

Verhalten sich zwei Verbindungen wie Bild und Spiegelbild zueinander, so wird dieses Phänomen als Chiralität bezeichnet und die beiden Verbindungen Enantiomere genannt. Ursache für Chiralität ist das Fehlen des Symmetrieelements der Drehspiegelachse. In diesem Fall wird von einem dissymmetrischen Molekül gesprochen. Fehlt zusätzlich auch eine Drehachse im Molekül, so ist es als asymmetrisch definiert<sup>[11]</sup>. Abb. 2 zeigt, daß es neben zentraler Chiralität (z.B. ein Kohlenstoffatom mit vier verschiedenen Substituenten) auch axiale Chiralität (z.B. Allene), planare Chiralität (z.B. Paracyclophane) und helicale Chiralität (z.B. Hexahelicen) gibt.



**Abb. 2** Verschiedene Arten der Chiralität.

Enzymatisch produzierte Moleküle liegen gewöhnlich enantiomerenrein vor, da sie an einem ebenfalls chiralen aktiven Zentrum eines Enzyms synthetisiert werden. Enantiomere unterscheiden sich nicht in ihren physikalischen Eigenschaften. Allerdings drehen enantiomere Moleküle die Schwingungsebene von linear polarisiertem Licht um einen Winkel  $\alpha$  (Drehwert). Enantiomere unterscheiden sich nur in ihrer optischen Aktivität; während ein Enantiomer die Schwingungsebene im Uhrzeigersinn um den Drehwert  $\alpha$  dreht, wird die Schwingungsebene vom anderen Enantiomer gegen den Uhrzeigersinn gedreht. Der absolute Wert des Drehwerts  $\alpha$  ist in beiden Fällen gleich, er ist nur von der Meßtemperatur, der Wellenlänge des verwendeten Lichts, der Küvettenlänge, der Konzentration des Enantiomers und dem Lösungsmittel abhängig. Ein reines Enantiomer hat somit einen spezifischen Drehwert  $[\alpha]_{\max}$ . Die optische Reinheit eines Enantiomerengemisches ergibt sich aus dem beobachteten Drehwert  $[\alpha]_{\text{obs}}$  der Mischung und  $[\alpha]_{\max}$ , sie wird in Prozent angegeben:

$$\% \text{ optische Reinheit} = \frac{[\alpha]_{\text{obs}}}{[\alpha]_{\max}} \cdot 100$$

Zur Bestimmung der absoluten Konfiguration einer enantiomerenreinen Verbindung wurde erstmals 1951 die anomale Röntgenbeugung von *Bijvoet* eingeführt. Die absolute Konfiguration von Molekülen mit UV-aktivem Chromophor kann alternativ durch Aus-

wertung des Cotton-Effektes im ORD- (optische Rotationsdispersion) bzw. CD- (Circulardichroismus) Spektrum analysiert werden.

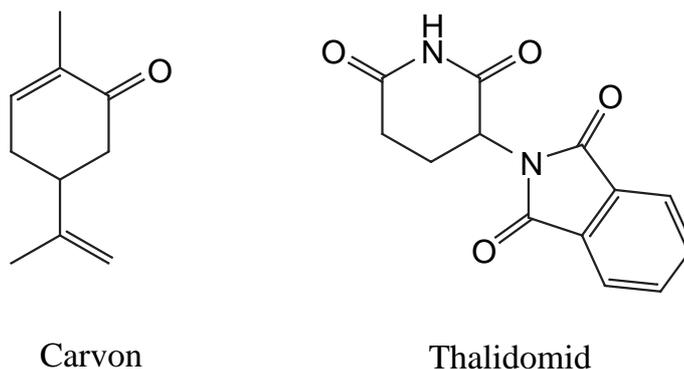
Zur Bestimmung der Enantiomerenreinheit wird neben der Bestimmung des Drehwertes auch die NMR-Spektroskopie und die Gaschromatographie eingesetzt. Grundsätzlich gibt es zwei verschiedene Methoden zur Ermittlung der optischen Reinheit.

1.) Enantiomerenmischungen werden mit einem reinen Enantiomer chemisch umgesetzt, so daß sich diastereomere Produkte mit unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften ergeben. Ein Beispiel ist die Derivatisierung von Aminen mit *Mosher's* Säure<sup>[12]</sup>. Das Verhältnis der diastereomeren Produkte kann dann mittels NMR oder GC analysiert werden.

2.) Enantiomerenmischungen werden in einer chiralen Umgebung analysiert. Für die NMR-Spektroskopie bieten sich dafür chirale Lanthanid-Shiftreagenzien wie  $\text{Eu}(\text{facam})_3$  (facam: 3-Trifluoracetyl-d-campher) an. In der Gaschromatographie werden stationäre Phasen mit chiralen Substituenten eingesetzt, um die Enantiomerenreinheit eines Gemisches zu bestimmen. Als chirale Selektoren werden Aminosäurederivate<sup>[13]</sup>, Amide<sup>[14]</sup>, Metallkomplexe<sup>[15]</sup> und derivatisierte Cyclodextrine<sup>[16]</sup> verwendet. Cyclodextrine zeichnen sich durch ihre hohe Temperaturstabilität und ihren großen Anwendungsbereich aus und werden daher heute überwiegend eingesetzt.

Die biologische Aktivität von Enantiomeren kann stark variieren. Interaktionen von chiralen Molekülen mit ebenfalls chiralen Rezeptormolekülen (meist Enzymen) können nur dann funktionieren, wenn das „richtige“ Enantiomer vorliegt („Schlüssel-Schloß-Prinzip“<sup>[17]</sup>). Folglich werden in der Natur chirale Bausteine stets enantiomerenrein synthetisiert. Bekannte Beispiele sind die Vorkommen von fast ausschließlich D-Zuckern und L-Aminosäuren in lebenden Systemen. Es gibt allerdings auch Organismen, die beide Enantiomere einer Verbindung synthetisieren. Beispiele sind verschiedene *Solidago* Arten, die sowohl (+)- als auch (-)-Germacren D synthetisieren<sup>[18]</sup>.

Wie unterschiedlich die physiologische Wirkung von Enantiomeren sein kann, zeigt das Beispiel des Monoterpenketons Carvon. Während das (+)-Carvon für den charakteristischen Geruch von Kümmel verantwortlich ist, vermittelt das (-)-Enantiomer ein Pfefferminz-Aroma (Spearmint) (Abb. 3). Ein weiteres Beispiel ist die pharmakologische Wirkung von Thalidomid (Handelsname: Contergan), dessen Enantiomere beide sedative Wirkungen besitzen. Allerdings besitzt nur eines der beiden Antipoden zusätzlich stark teratogene Eigenschaften (Abb. 3).

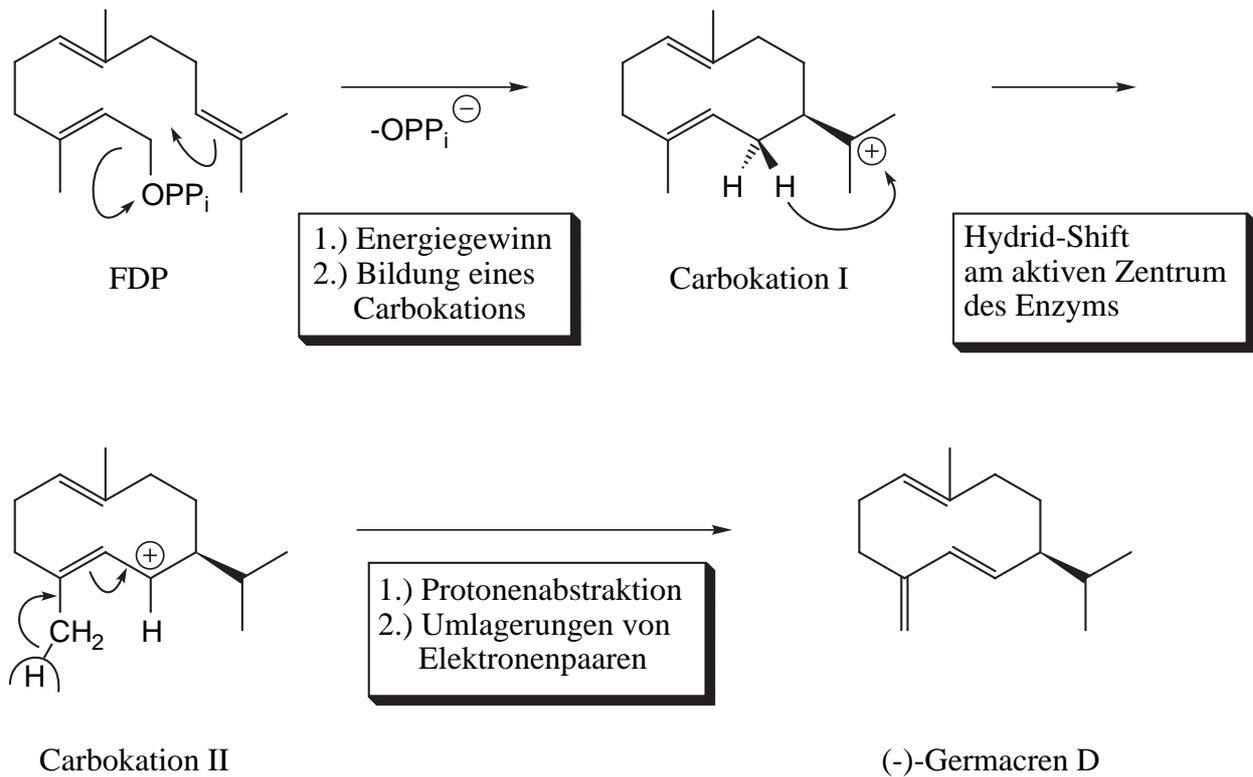


**Abb. 3** Strukturen von Carvon und Thalidomid.

Besonders das tragische Beispiel Contergan macht die Berücksichtigung stereochemischer Eigenschaften deutlich. Außerdem zeigt es, wie wichtig die enantioselektive Synthese von Verbindungen ist. Zwar gibt es mittlerweile eine Vielzahl organischer Synthesen, die Zugang zu enantiomerenreinen Verbindungen liefern, allerdings sind diese Synthesestrategien meist teuer und bieten nur geringe Ausbeuten. Eine Alternative stellt die enzymatische Synthese von Enantiomeren dar.

### 1.3 Biosynthese von Sesquiterpenen

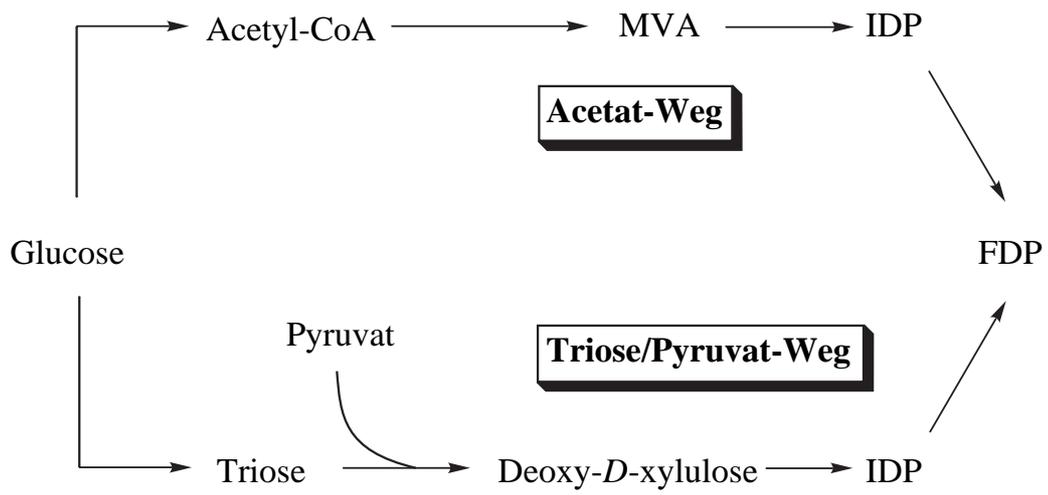
Die Biosynthese von Sesquiterpenen wird durch sog. Synthasen (Sesquiterpen-Cyclasen) katalysiert, die als Substrat das acyclische (*E,E*)-Farnesyldiphosphat (FDP) verwenden<sup>[19]</sup>. Initialschritt der Sesquiterpen-Synthese ist stets die Abspaltung von anorganischem Diphosphat aus FDP. Zum einen dient dies der Energiegewinnung (treibende Kraft der Cyclisierungsreaktion), zum anderen wird so ein Carbokation erzeugt, das umgelagert und cyclisiert werden kann. Sämtliche Schritte werden enantioselektiv von den Synthasen katalysiert, da sich das Carbokation in einer hydrophoben Tasche des Enzyms befindet. Die hydrophobe Tasche schützt einerseits das Kation vor Umgebungseinflüssen und ist andererseits ein chiraler Hohlraum, der aus den Aminosäuren des Enzyms gebildet wird und somit die Enantioselektivität der Katalyse hervorruft. Während der Cyclisierung können neben Wagner-Meerwein-Umlagerungen auch noch Hydrid-Shifts und Protonenabstraktionen bzw. Protonenaufnahmen stattfinden. Abb. 4 zeigt exemplarisch die Biosynthese von (-)-Germacren D, die durch (-)-Germacren-D-Synthase katalysiert wird<sup>[20]</sup>.



**Abb. 4** Cyclisierungsmechanismus der (-)-Germacren D-Biosynthese.

Die Biosynthese des Substrates FDP erfolgt durch Verknüpfung von drei Isopentenyl-diphosphat-Einheiten (IDP)<sup>[21]</sup>. IDP wiederum kann auf zwei unterschiedlichen Wegen synthetisiert werden. Der erste Weg verläuft über Acetyl-CoA (gewonnen aus Glucose) und Mevalonsäure (MVA) und wird als der klassische Weg der IDP-Biosynthese bezeichnet (Acetatweg)<sup>[22]</sup>. Eine alternative Biosynthese von IDP wurde erstmals 1994 publiziert<sup>[23]</sup>. Hierbei wird Pyruvat mit einer phosphorylierten Triose (Glycerinaldehyd-3-phosphat, ebenfalls aus Glucose gewonnen) verknüpft und  $\text{CO}_2$  abgespalten. Die gebildete 1-Deoxy-D-xylulose wird abschließend zu IDP reduziert (Triose/Pyruvat-Weg). Die Biosynthese von FDP ist in Abb. 5 schematisch dargestellt. Eine genauere Betrachtung des Acetat- und Triose/Pyruvat-Weges erfolgt in Kapitel 3.2.1 Biosynthese von Isopentenyl-diphosphat (IDP).

Welcher Weg zur Biosynthese von IDP bei höheren Pflanzen eingeschlagen wird, hängt vom Zellkompartiment ab, in dem das IDP gebildet wird. Allgemein gilt, daß in Plastiden und Mitochondrien IDP auf dem Triose/Pyruvat-Weg synthetisiert wird, während im Cytosol der Acetatweg beschritten wird. Da Monoterpene, Diterpene und Carotinoide in Plastiden gebildet werden und Ubichinon sowie Plastochinon in den Mitochondrien, werden diese Verbindungen aus IDP, das dem Triose/Pyruvat-Weg entstammt, synthetisiert. Die Biosynthese von Sesquiterpenen, Triterpenen und Steroiden hingegen erfolgt im Cytosol, so daß für ihre Biosynthese IDP aus dem Acetatweg verwendet wird.



**Abb. 5** Schematische Darstellung der beiden Biosynthesewege für IDP.



## 2 Problemstellung

Seit der Entdeckung, daß in verschiedenen *Solidago*-Arten (Goldrute) beide Enantiomere des Sesquiterpens Germacren D auftreten, wurde spekuliert, wie sich die Biosynthese beider Enantiomere gestaltet. Verschiedene Hypothesen besagten, daß es möglicherweise zwei verschiedene Synthesen gibt, andererseits könnte auch ein einzelnes Enzym verantwortlich sein, das nur ein Intermediat synthetisiert, das wiederum „willkürlich“ zu beiden Enantiomeren weiterreagiert. Eine dritte Theorie besagte, daß Germacren D in *Solidago* eventuell gar nicht enzymatisch gebildet wird, sondern direkt aus FDP entsteht. Obwohl die Hypothese, die zwei verschiedene Enzyme vorhersagt, sicherlich am wahrscheinlichsten ist, konnte sie zunächst nicht bewiesen werden.

Durch die Einführung neuer Enzymisolationstechniken ist es mittlerweile möglich, auch Sesquiterpen-Synthesen aus höheren Pflanzen zu isolieren. Damit ergibt sich eine Möglichkeit, die eingangs erwähnten Hypothesen zu verifizieren. Als Pflanzenmaterial bot sich die in Mitteleuropa heimische Pflanze *Solidago canadensis* an.

Zusätzlich sollte der erste Schritt der Biosynthese des Sesquiterpenketons (-)-Cyclocoloranon in *S. canadensis* aufgeklärt werden. Vermutet wurde, daß der erste Schritt die Synthese des Sesquiterpens (-)- $\alpha$ -Gurjunen ist. Somit müßte es möglich sein, die entsprechende Sesquiterpen-Synthase aus *S. canadensis* zu isolieren.

Abschließend sollten die Cyclisierungsmechanismen der isolierten Sesquiterpen-Synthesen aufgeklärt werden. Ansatz hierfür war die Verfütterung von deuterierten Substraten an die Enzyme mit nachfolgender Strukturaufklärung der synthetisierten Sesquiterpene. Auf diesem Wege sollte die Position der Deuterium-Markierung bestimmt werden, um Mechanismen postulieren bzw. beweisen zu können.

Es ergaben sich somit folgende Aufgaben:

- Synthese von deuterierten Substraten (FDP), die Deuterium-Atome an verschiedenen Positionen tragen. Teilweise sollten dazu enantioselektive Synthesen eingesetzt werden.
- Isolierung verschiedener Sesquiterpen-Synthesen aus *S. canadensis* mit Hilfe empfindlichster Enzym-Isolierungsmethoden.
- Biochemische Charakterisierung der isolierten Synthesen (Bestimmung von molaren Massen, pH-Optima, Reinheitsgrad, Kinetik,  $K_M$ -Werte).
- Entwicklung von Enzymassays, die eine Verfütterung von markierten Substraten erlauben (sowohl für Assays mit radioaktiv markierten Substraten, um die Homogenität der Produktbildung zu beweisen, als auch für Assays mit deuterierten Verbindungen für Mechanismus Studien).
- Analyse der deuterierten Sesquiterpene mit Hilfe verschiedener massenspektrometrischer Techniken, um die Cyclisierungsmechanismen aufzuklären.



## 3 Allgemeiner Teil

Inhalt der vorliegenden Dissertation ist die Aufklärung der Biosynthese von (+)-Germacren D, (-)-Germacren D und (-)- $\alpha$ -Gurjunen.

Die folgenden Kapitel sollen eine Übersicht über die Grundlagen geben, die zum Verständnis der durchgeführten Experimente und die Deutung ihrer Ergebnisse hilfreich sind.

Um die Biosynthese von Sesquiterpenen analysieren zu können, ist zunächst eine Analytik der Sesquiterpene notwendig (siehe Kapitel 3.1 Sesquiterpenanalytik). Fernerhin wird auf die Grundlagen der Sesquiterpenbiosynthese eingegangen (siehe Kapitel 3.2 Grundlagen der Biosynthese von Sesquiterpenen) und ein Überblick über Enzymisolierungstechniken gegeben (siehe Kapitel 3.3 Methoden der Enzymisolierung). Abschließend wird auf die molekularbiologischen Grundlagen von Sesquiterpen-Synthasen eingegangen (siehe Kapitel 3.4 Molekularbiologie der Sesquiterpen-Synthasen).

### 3.1 Sesquiterpenanalytik

Die Analytik von Sesquiterpenen gliedert sich in mehrere Teile. Zunächst muß ein ätherisches Öl aus einer Pflanze (oder einem anderen Organismus) gewonnen werden, in dem sich eine Vielzahl leichtflüchtiger Stoffe befinden. Aus diesem komplexen Gemisch müssen sodann einzelne Komponenten (z.B. Sesquiterpene) isoliert werden. Isolierte Komponenten stehen einer Analyse mittels spektroskopischer Methoden zur Verfügung, um eine Strukturaufklärung vornehmen zu können. Ein besonderes Augenmerk bei der Strukturaufklärung gilt der Enantiomerenanalytik von Sesquiterpenen.

#### 3.1.1 Ätherische Öle

Ätherische Öle können aus ganzen Pflanzen oder auch aus einzelnen Teilen einer Pflanze (Blätter, Blüten, Stengel, Wurzel etc.) mit Hilfe einer Wasserdampfdestillation gewonnen werden. Die Zusammensetzung eines ätherischen Öls kann u.U. je nach verwendetem Pflanzenteil variieren. Die Wasserdampfdestillation ist eine Co-Destillation von Wasser mit leichtflüchtigen, mit Wasser nicht mischbaren, organischen Substanzen. Diese Art der Destillation bietet eine schonende Möglichkeit temperaturlabile Verbindungen unterhalb ihres Siedepunktes bei Normaldruck zu destillieren. Die extrahierten Komponenten werden in Hexan oder Pentan gesammelt<sup>[24]</sup>.

Schon seit Jahrtausenden besitzen ätherische Öle in vielen Kulturkreisen Bedeutung als Weihrauch, Medizin, Duftstoffe oder als Einbalsamierungsmittel<sup>[10]</sup>. Auch heute finden ätherische Öle noch eine vielfältige Anwendung in der pharmazeutischen Industrie, Parfümindustrie und der Lebensmittelindustrie. So werden z.B. in Lebensmitteln Gewürzöle

zur Aromatisierung eingesetzt. Da ein ätherisches Öl aus einer Vielzahl von leichtflüchtigen Komponenten zusammengesetzt ist, gewinnt die Analytik dieser Öle eine große Bedeutung, zumal gewöhnlich nur bestimmte Komponenten des Öls für die gewünschten Eigenschaften (z.B. das Aroma) verantwortlich sind.

Zur Isolierung einzelner Komponenten aus ätherischen Ölen stand bis in die 50iger Jahre nur die Destillation des Gemisches zur Verfügung. Anfang der 60iger Jahre wurde dann erstmals von *Guenther et al.*<sup>[25]</sup> die Gaschromatographie zur Analyse von ätherischen Ölen benutzt. Die Weiterentwicklung der Gaschromatographie (Kapillargaschromatographie) und die spätere Einführung der Kopplung von Gaschromatographie und Massenspektrometrie (GC-MS) ermöglichten eine Vereinfachung der Identifizierung von Inhaltsstoffen, da nun das Öl ohne vorherige Aufarbeitung verwendet werden konnte.

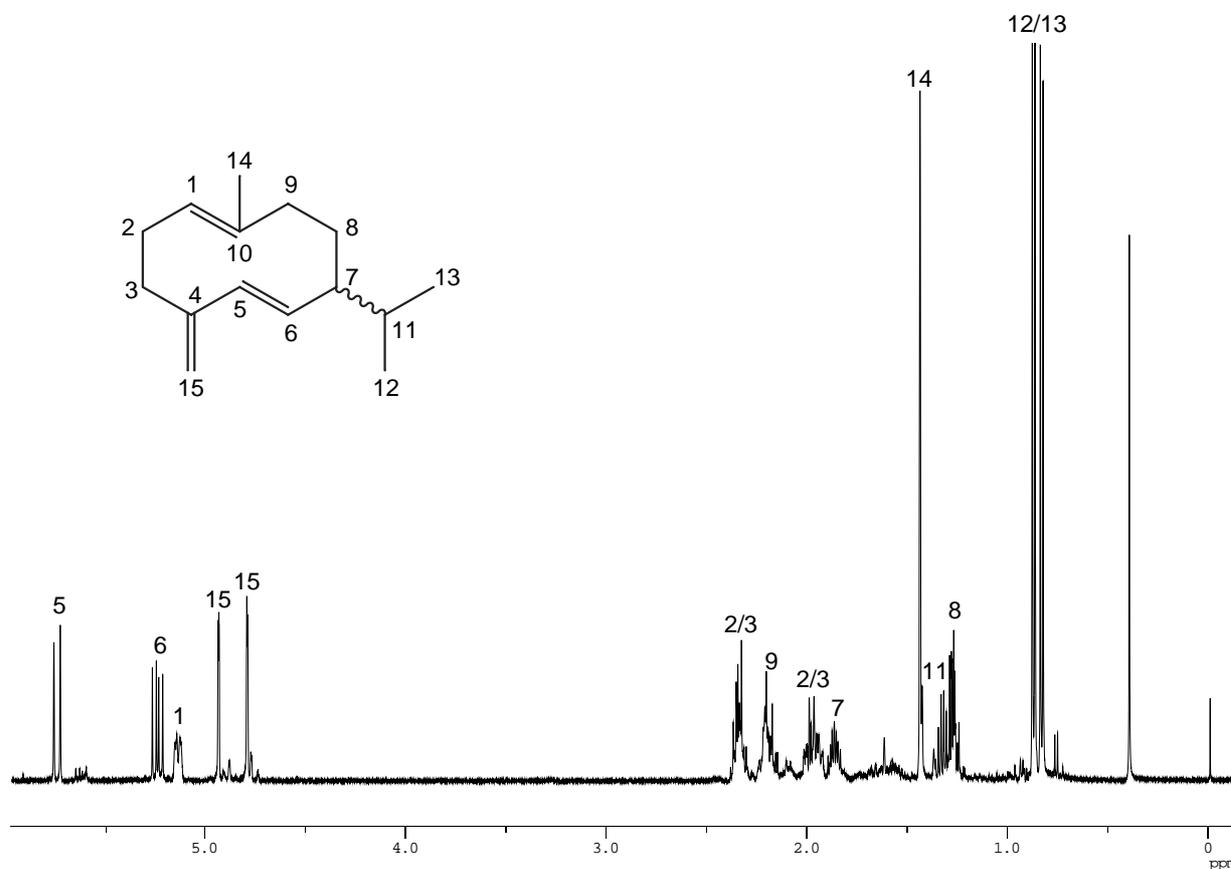
Gerade im Bereich der Sesquiterpenanalytik ist jedoch die Verwendung von GC-MS allein nicht immer ausreichend. In Einzelfällen können sowohl Retentionszeiten als auch Massenspektren von zwei unterschiedlichen Verbindungen nahezu identisch sein<sup>[26]</sup>. Beim Auftreten von bisher nicht identifizierten Verbindungen in einem ätherischen Öl reicht GC-MS als alleinige Identifizierungsmethode gewöhnlich ebenfalls nicht aus. In solchen Fällen müssen zusätzlich NMR-spektroskopische Methoden zur Identifizierung herangezogen werden.

Ein Problem der NMR-Spektroskopie besteht darin, daß nur reine Verbindungen analysiert werden können. Somit müssen einzelne Sesquiterpene zunächst in Reinform aus einem ätherischen Öl isoliert werden. Neben den veralteten Methoden der Destillation und Kieselgel-Chromatographie, stehen dafür die Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC), präparative Dünnschicht-Chromatographie (DC) und präparative Gaschromatographie zur Verfügung. Für Trennprobleme von Doppelbindungsisomeren hat sich die HPLC bzw. DC mit Silbernitrat imprägnierten Trennphasen etabliert<sup>[27]</sup>. Für eine Vielzahl anderer Trennprobleme hat sich die präparative Gaschromatographie bewährt<sup>[28]</sup>. Zudem bietet die präparative GC auch Zugang zur Trennung von Enantiomeren, da als stationäre GC-Phasen Cyclodextrinderivate verwendet werden können.

### 3.1.2 Strukturaufklärung von Sesquiterpenen

Wird ein bisher nicht charakterisiertes Sesquiterpen isoliert, so stellt sich das Problem der Strukturaufklärung. Da Massenspektren von Sesquiterpenen gewöhnlich nicht aussagekräftig genug zur Strukturaufklärung sind, müssen andere Techniken herangezogen werden. Besonders bewährt hat sich in diesem Zusammenhang die NMR-Spektroskopie (Nuclear Magnetic Resonance). Hierbei wird die Wechselwirkung einzelner Atomkerne im Molekül mit elektromagnetischer Strahlung gemessen<sup>[29]</sup>. Für die Naturstoffanalytik werden gewöhnlich Wasserstoffatome (<sup>1</sup>H-NMR) und Kohlenstoffatome (<sup>13</sup>C-NMR) analysiert. Um aussagekräftige Spektren von Sesquiterpenen zu erhalten, werden im Falle der <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie Mengen im Bereich >0.1 mg benötigt und für die <sup>13</sup>C-NMR-

Spektroskopie Mengen >1.0 mg. Abb. 6 zeigt exemplarisch das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum des Sesquiterpens Germacren D, dessen Biosynthese in der vorliegenden Dissertation untersucht wurde.



**Abb. 6**  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum (500MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ) von Germacren D (die angegebenen Nummern entsprechen den Kohlenstoffatomen, an denen sich die detektierten Protonen befinden).

Die Zuordnung der detektierten Signale im  $^1\text{H-NMR}$  von Germacren D kann teilweise durch die Verschiebung der Signale und ihre Kopplungskonstanten erfolgen (Bsp.: Tieffeld verschobene olefinische Protonen)<sup>[30]</sup>. Ein Problem stellen in diesem Fall jedoch die Methylengruppen dar, deren Signale nicht direkt zugeordnet werden können. Für ihre Zuordnung müssen zusätzliche zweidimensionale NMR-Spektren aufgenommen werden<sup>[31]</sup>.

Ein häufig verwendetes 2D-NMR-Experiment ist das COSY-Experiment (Correlated Spectroscopy)<sup>[32]</sup>, bei dem Kopplungen benachbarter Atome analysiert werden. Neben  $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$ -Spektren haben sich auch  $^1\text{H-}^{13}\text{C-COSY}$ -Spektren etabliert (z.B. HMQC = Heteronuclear Multiple Quantum Coherence für skalare Kopplungen). In einigen Fällen sind phasensensitive 2D-COSY-Spektren aussagekräftiger, da sie detailliertere Informationen über Kopplungskonstanten liefern. Der Nuclear-Overhauser-Enhancement (NOE)-Effekt wird in der zweidimensionalen NMR-Spektroskopie für sog. NOESY-Spektren genutzt. Sie können Informationen über die dreidimensionale Struktur eines Moleküls

liefern, da sie Kopplungen räumlich benachbarter Atomkerne messen, die nicht direkt über kovalente Bedingungen miteinander verknüpft sein müssen. Fernkopplungen können durch COLOC-Spektren (Correlation via long range couplings) detektiert werden. Mittels HMBC-Spektren (Heteronuclear Multiple Bond Coherence) werden Fernkopplungen zwischen verschiedenen Atomkernen gemessen. Der Nachteil vieler 2D-NMR-Experimente ist, daß Substanzmengen  $>10$  mg benötigt werden. Teilweise kann es vorteilhafter sein, gezielte chemische Umsetzungen der unbekanntes Verbindung durchzuführen, um diese so in bekannte Verbindungen zu überführen. Vor allem Umlagerungs-, Hydrierungs- und Dehydratisierungsreaktionen<sup>[33]</sup> haben sich in diesem Zusammenhang bewährt.

Sollte durch die oben genannten Experimente immer noch keine eindeutige Zuordnung einer Struktur möglich sein, so bleibt als letzte Möglichkeit die Totalsynthese der vermuteten Verbindung<sup>[34]</sup>.

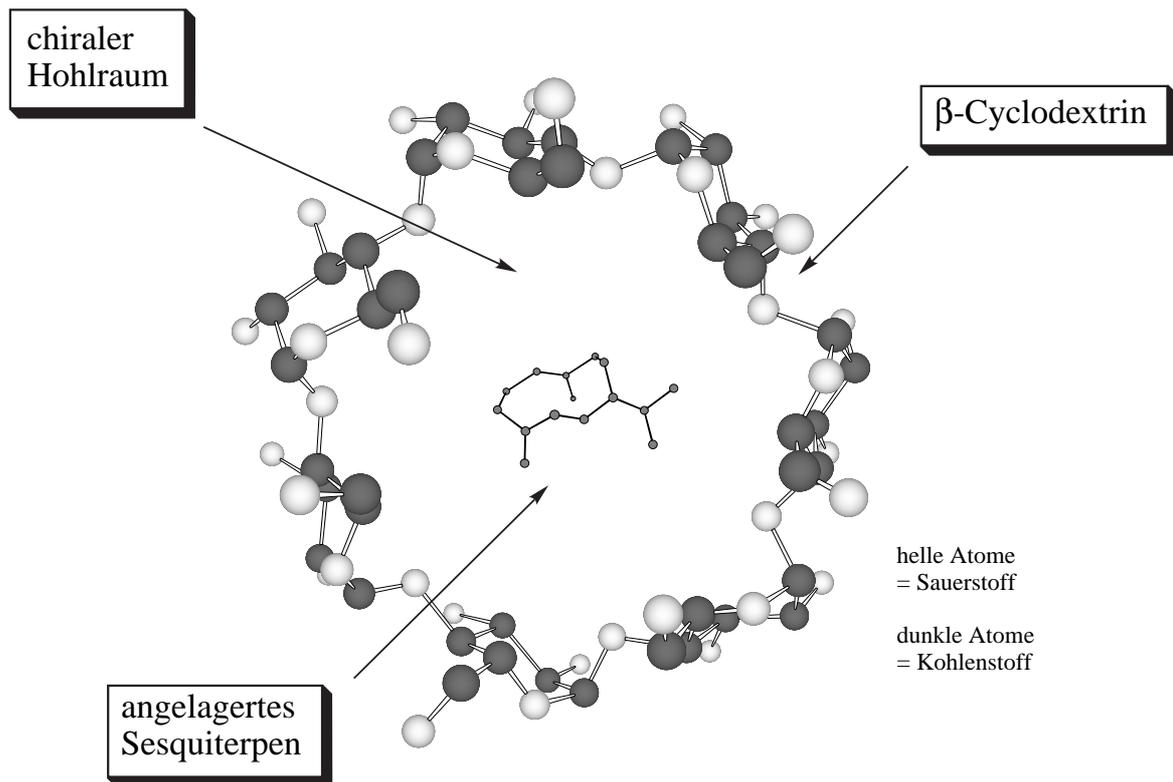
Als besonders wertvoll für die Analytik von ätherischen Ölen haben sich Massenspektren-Bibliotheken erwiesen. Sobald eine Verbindung zweifelsfrei identifiziert ist, kann ihr Massenspektrum als Referenz dienen, da das Fragmentierungsmuster dieser Spektren sehr charakteristisch ist (Ausnahmen können diastereomere Moleküle sein). In Kombination mit einer GC-MS-Analyse können MS-Spektren-Bibliotheken<sup>[35]</sup> eine Vielzahl von Komponenten schnell und sicher identifizieren.

### 3.1.3 Enantiomerenanalytik von Sesquiterpenen

Die meisten Sesquiterpene besitzen eines oder mehrere Chiralitätszentren. Somit muß neben der eigentlichen Strukturaufklärung auch eine Enantiomerenanalytik durchgeführt werden. Von den gängigen Methoden zur Bestimmung eines Enantiomerenverhältnisses (siehe Kapitel 1.2 Chiralität) ist die enantioselektive Gaschromatographie am gebräuchlichsten für die Sesquiterpenanalytik.

Als stationäre GC-Phasen werden modifizierte Cyclodextrine verwendet<sup>[16]</sup>. Cyclodextrine sind Oligosaccharide, die aus sechs, sieben oder acht  $\alpha$ -1,4-glycosidisch verknüpften D-Glucopyranoseeinheiten gebildet werden. Sie werden als  $\alpha$ -,  $\beta$ - bzw.,  $\gamma$ -Cyclodextrin bezeichnet. Da Cyclodextrine definierte Hohlräume besitzen, können sie in einer Wirt-Gast-Beziehung Enantiomere anlagern bzw. includieren. Möglich werden solche Anlagerungen u.a. durch van-der-Waals-Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen. Es entstehen diastereomere Komplexe, da Cyclodextrine ebenfalls chiral sind. Die entstandenen Komplexe sind unterschiedlich stabil, was letztlich zu unterschiedlichen Retentionszeiten der Enantiomere führt.

Abb. 7 zeigt als Beispiel die Anlagerung von (+)-Germacren D an ein unmodifiziertes  $\beta$ -Cyclodextrin. Die Zeichnung stellt nur das Prinzip der Anlagerung dar, nicht die exakten Verhältnisse.



**Abb. 7**  $\beta$ -Cyclodextrin mit angelagertem (+)-Germacren D, die Größenverhältnisse sind nicht proportional (Zeichnung mit Chem3D Pro, Cambridge Soft, erstellt).

Cyclodextrine werden durch enzymatischen Abbau von Stärke und selektive Ausfällung gewonnen.

Für die Kapillar-GC sind underivatisierte Cyclodextrine ungeeignet, da sie sich beim Schmelzen zersetzen. Dieses Problem wird umgangen durch Derivatisierungen der 2-, 3- und 6-OH Gruppen mit Methyl-, Pentyl-, Butyryl- oder *tert*-Butyldimethylsilyl-Resten.

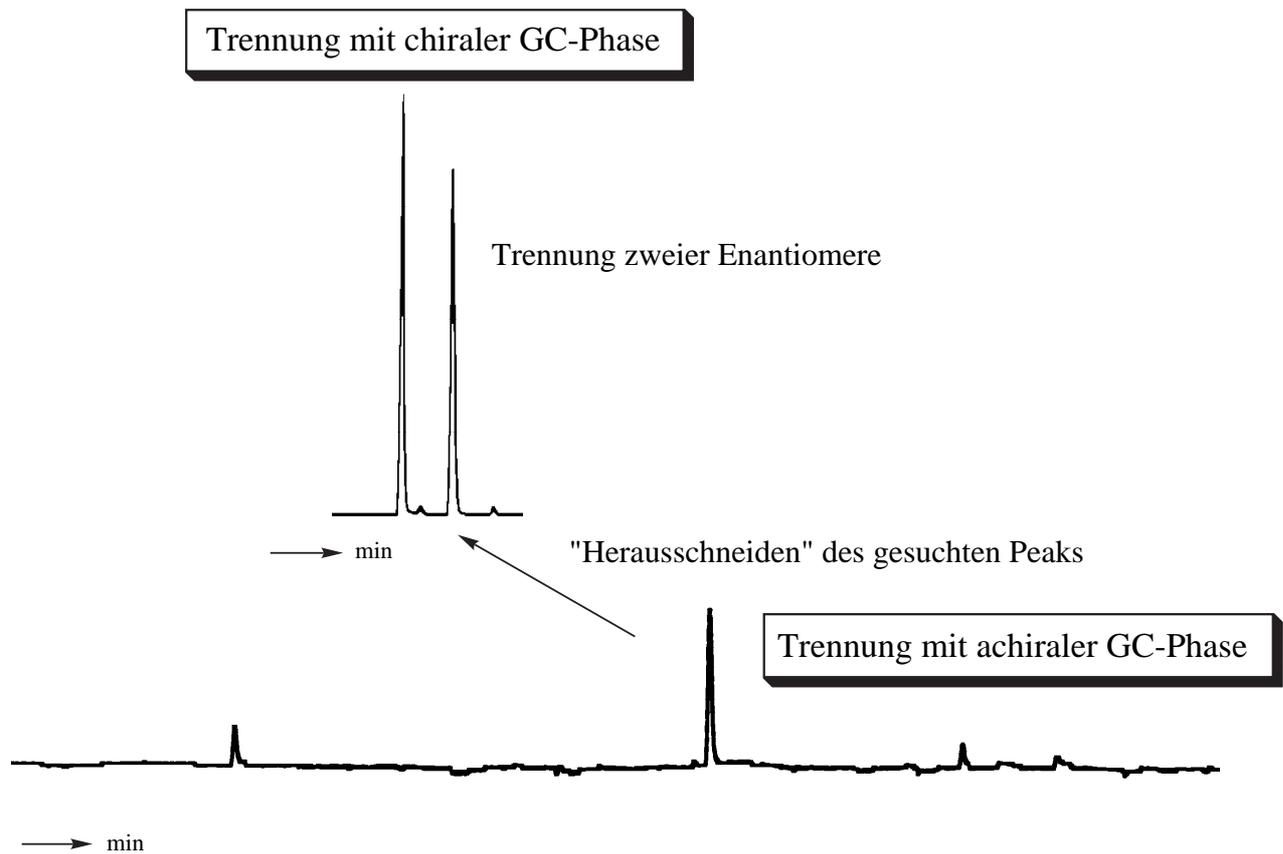
Eine Vielzahl von natürlichen Verbindungen konnte bisher mit Cyclodextrinphasen getrennt werden. Dazu zählen Terpene, Duftstoffe, Pheromone, Hormone, Hydroxysäuren, Pharmaka, Biphenyle, Allene, Paracyclophane und Metallkomplexe. Folgende Cyclodextrinderivate werden häufig für die Enantiomerenanalytik verwendet:

- Octakis(3-O-butyryl-2,6-di-O-pentyl)- $\gamma$ -cyclodextrin (LIPODEX E)
- Heptakis(2,6-di-O-methyl-3-O-pentyl)- $\beta$ -cyclodextrin (2,6-Me-3-Pe- $\beta$ -CD)
- Heptakis(6-O-*tert*-butyldimethylsilyl-2,3-di-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin (6-T-2,3-Me- $\beta$ -CD)

Durch den Einsatz von gepackten Säulen mit chiraler stationärer Phase konnten Enantiomere auch in präparativen Mengen getrennt werden (präparative Gaschromatographie)<sup>[28]</sup>.

Eine weitere wichtige Methode der Enantiomerenanalytik ist die zweidimensionale Gaschromatographie (2D-GC)<sup>[36]</sup>. Dieses Verfahren erlaubt auch dann noch die Bestim-

mung eines Enantiomerenverhältnisses, wenn sich die gesuchten Verbindungen in einer komplexen Mischung befinden. Dazu wird die Mischung zunächst über eine achirale Kapillarsäule getrennt und der gesuchte Peak „herausgeschnitten“ und auf eine Kapillarsäule mit chiraler Phase umgeleitet. Mit Hilfe der chiralen Phase wird dann die eigentliche Enantiomerenanalytik durchgeführt (Abb. 8).



**Abb. 8** Prinzip der 2D-GC.

Zur Ermittlung der Elutionsreihenfolge zweier Enantiomere, werden Koinjektionen mit enantiomerenreinen Referenzproben durchgeführt. Eine intensive Enantiomerenanalytik der Sesquiterpene zeigte, daß Lebermoose, die zu den niederen Pflanzen gehören, häufig die ungewöhnlichen *ent*-Sesquiterpene enthalten<sup>[37]</sup>. Sesquiterpene in „gewöhnlicher“ Konfiguration werden hingegen meist nur in höheren Pflanzen gefunden.

## 3.2 Grundlagen der Biosynthese von Sesquiterpenen

Die Biosynthese der Sesquiterpene wird durch eine Vielzahl von Enzymen katalysiert. In den meisten Fällen werden Sesquiterpene nach dem Schema in Abb. 9 synthetisiert.

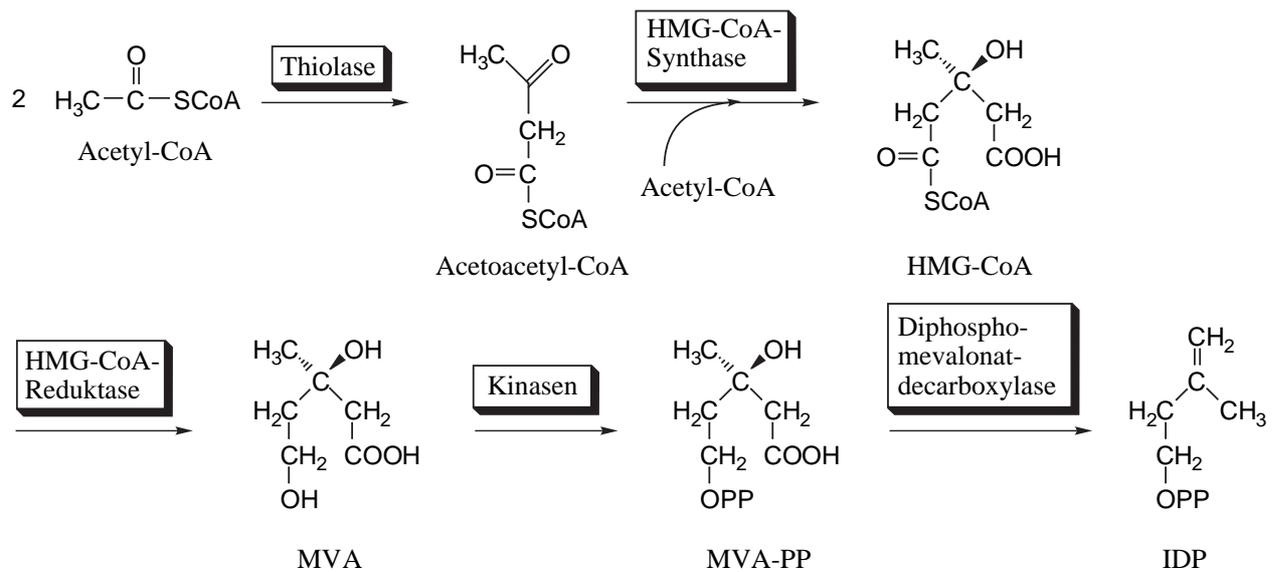


**Abb. 9** Schematische Biosynthese von Sesquiterpenen.

In den folgenden Kapiteln sollen die einzelnen involvierten Schritte genauer diskutiert werden. In Kapitel 3.2.1 wird auf die Biosynthese von Isopentenylidiphosphat (IDP) eingegangen und auch auf die Problematik, daß zwei unterschiedliche Wege seiner Synthese in Organismen realisiert sein können. Neben dem in Abb. 9 angedeuteten Acetatweg kann auch der sog. Triose/Pyruvat-Weg besprochen werden (siehe auch Kapitel 1.3 Biosynthese von Sesquiterpenen). Kapitel 3.2.2 beschäftigt sich mit der Synthese von Farnesyldiphosphat (FDP) und in Kapitel 3.2.3 wird auf die Cyclisierung von FDP zu Sesquiterpenen eingegangen. Letztere Synthese wird durch Sesquiterpen-Synthasen katalysiert, deren Mechanismen ebenfalls diskutiert werden. Abschließend wird in Kapitel 3.2.4 der Nutzen der Sesquiterpen Biosynthese behandelt.

### 3.2.1 Biosynthese von Isopentenylidiphosphat (IDP)

Im Cytosol von höheren Pflanzen wird IDP gewöhnlich auf dem sog. Acetatweg synthetisiert (so benannt nach der Verwendung von Acetylcoenzym A als Ausgangssubstrat)<sup>[22]</sup>. Erster Schritt dieses Weges ist die Verknüpfung von zwei Acetyl-CoA-Einheiten zu Acetoacetyl-CoA unter Katalyse einer Thiolase. Acetoacetyl-CoA wird dann mit einem weiteren Acetyl-CoA-Molekül verknüpft, so daß (3*S*)- $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) gebildet wird (katalysierendes Enzym: HMG-CoA-Synthase). HMG-CoA-Reduktase reduziert im nächsten Schritt HMG-CoA zu (*R*)-Mevalonsäure (MVA), die wiederum durch Kinasen phosphoryliert wird zu (*R*)-Mevalonsäurediphosphat (MVA-PP). Letzter Schritt ist eine Decarboxylierung und H<sub>2</sub>O-Eliminierung, katalysiert durch Diphosphomevalonatdecarboxylase. Abb. 10 zeigt das Biosynthese-Schema mit allen Zwischenstufen. Die Energiebilanz zeigt, daß ein NADH und drei ATP-Äquivalente während der IDP-Synthese verbraucht werden.

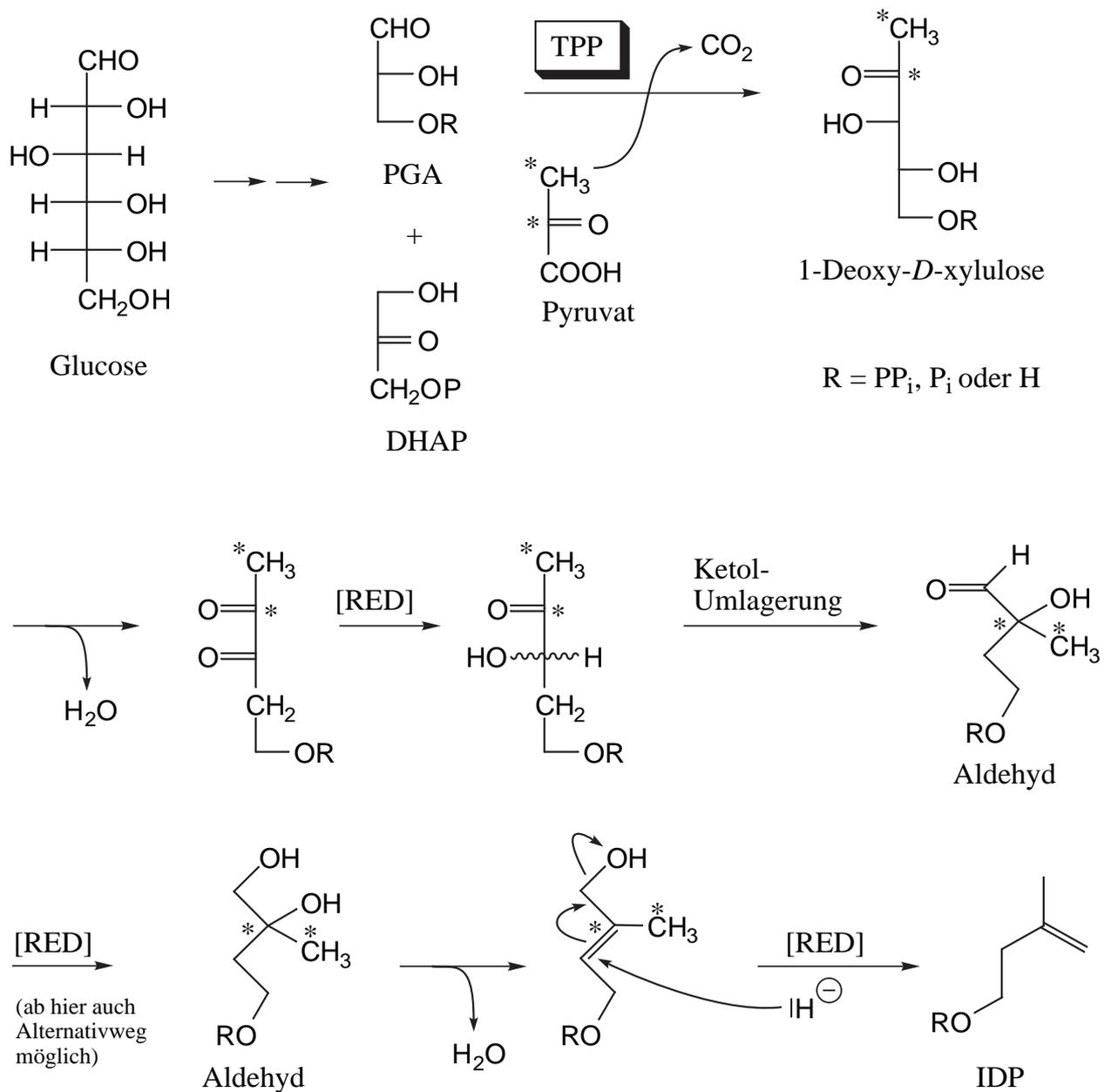


**Abb. 10** Biosynthese von IDP auf dem Acetatweg.

Da der Acetatweg im Cytosol von Zellen lokalisiert ist, wird das so produzierte IDP für die Biosynthese von Sesquiterpenen, Triterpenen und Steroiden verwendet, da deren Biosynthese ebenfalls im Cytosol lokalisiert ist.

In Mitochondrien (Ort der Biosynthese von Plastochinon und Ubichinon) und Plastiden (Ort der Biosynthese von Monoterpenen, Diterpenen und Carotinoiden) wird IDP auf dem Triose/Pyruvat-Weg synthetisiert<sup>[23]</sup>. Formal wird aus einer Pyruvat-Einheit  $\text{CO}_2$  abgespalten und die verbleibende  $\text{C}_2$ -Einheit in eine Triose inseriert.

Erster Schritt des Triose/Pyruvat-Weges ist die Spaltung von Glucose in Phosphoglycerinaldehyd (PGA) und Dihydroxyacetonphosphat (DHAP). Nur PGA wird im weiteren Verlauf der Synthese verwendet. Nächster Schritt ist die Verknüpfung von PGA mit Pyruvat unter Verlust von  $\text{CO}_2$ . Das  $\text{CO}_2$ -Molekül wird selektiv aus dem Pyruvat abgespalten; dieser Schritt benötigt als Co-Faktor Thiamindiphosphat (TDP). Das Verknüpfungsprodukt ist die Deoxypentulose 1-Deoxy-*D*-xylulose, die im folgendem ein  $\text{H}_2\text{O}$ -Molekül abspaltet und sodann reduziert wird. Die resultierende Deoxypentulose wird dann einer Ketol-Umlagerung unterworfen, die in ähnlicher Form auch bei der Leucin- und Valin-Biosynthese nachgewiesen wurde. Der so entstandene Aldehyd wird abschließend reduziert und führt unter Abspaltung von  $\text{H}_2\text{O}$  zum IDP. Abb. 11 zeigt nur einen möglichen Weg, auf dem IDP aus dem Aldehyd synthetisiert werden kann. Alternativ gibt es auch einen Weg, der ebenfalls zu IDP führt und dabei Pyridoxalphosphat als Co-Faktor benötigt<sup>[23]</sup>. Welcher der beiden Möglichkeiten tatsächlich realisiert ist, konnte bis heute nicht geklärt werden.



**Abb. 11** Biosynthese von IDP auf dem Triose/Pyruvat-Weg.

Um zu entscheiden, ob der Acetatweg oder der Triose/Pyruvat-Weg für die Biosynthese einer bestimmten Verbindung gewählt wird, stehen verschiedene Mittel zur Verfügung. Wird IDP auf dem Acetatweg synthetisiert, so kann diese Synthese durch die Verwendung von Inhibitoren bestimmter Enzyme unterbunden werden. Besonders bewährt hat sich für diesen Zweck Mevinolin (Abb. 12), das als kompetitiver Inhibitor der HMG-CoA-Reduktase dient<sup>[38]</sup>. Durch seine Verwendung wird selektiv die Produktion von IDP im Cytosol inhibiert. Dies hat zur Folge, daß z.B. Sesquiterpene nicht mehr gebildet werden können. Diterpene, deren Biosynthese ebenfalls IDP benötigt, werden hingegen weiter synthetisiert, da ihr IDP auf dem Triose/Pyruvat-Weg in den Plastiden gebildet wird.

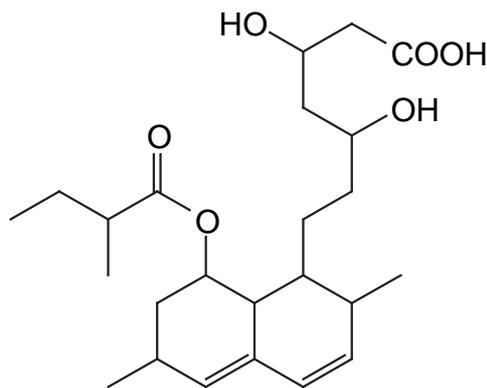


Abb. 12 Mevinolin.

Zur Analyse ob IDP auf dem Triose/Pyruvat-Weg gebildet wird, hat sich ein elegantes Markierungsexperiment etabliert<sup>[39]</sup>. Deuterierte 1-Deoxy-*D*-xylulose wird an einen Organismus verfüttert und die produzierten Zielmoleküle per Massenspektrometrie analysiert. Sollte der Triose/Pyruvat-Weg realisiert sein, so müßten die Zielmoleküle (z.B. Diterpene)

Deuteriummarkierungen tragen. Selbst wenn die Einbauraten des markierten Substrates nur bei ca. 10% liegen, kann eine Aussage über den genutzten IDP-Biosynthese Weg getroffen werden.

Für die Analytik der Sesquiterpenbiosynthese in höheren Pflanzen ist eine Untersuchung des verwendeten IDP-Biosynthese Weges gewöhnlich nicht nötig, da es heute als gesichert gilt, daß in diesem Fall die Sesquiterpene im Cytosol gebildet werden und somit der Acetatweg zur Synthese von IDP genutzt wird.

### 3.2.2 Biosynthese von (*E,E*)-Farnesyldiphosphat (FDP)

Die Biosynthese von (*E,E*)-FDP (im folgendem stets als FDP bezeichnet) benötigt Isopentenylidiphosphat (IDP) als Substrat<sup>[40]</sup>. Erster Schritt der Synthese ist die Isomerisierung von IDP zu Dimethylallyldiphosphat (DMADP), katalysiert durch Isopentenylidiphosphat-Isomerase<sup>[41]</sup>. In einer 1'-4-Kondensationsreaktion wird DMADP mit IDP verknüpft, wobei Geranyldiphosphat (GDP) entsteht. Im letzten Schritt der FDP-Synthese wird GDP mit einer weiteren IDP-Einheit verknüpft und unter Abspaltung von Diphosphat entsteht FDP. Die Verknüpfung von DMADP mit zwei IDP-Einheiten wird durch die Farnesyldiphosphat-Synthase (Transferase) katalysiert (Abb. 13)<sup>[21]</sup>.

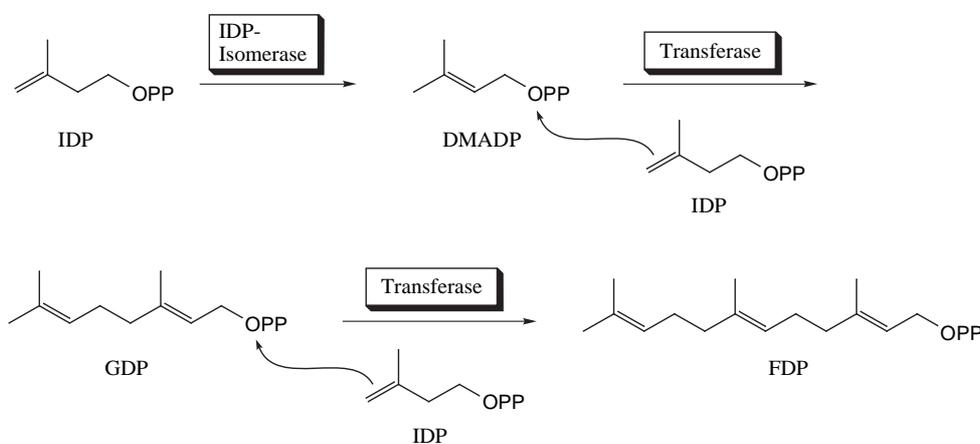


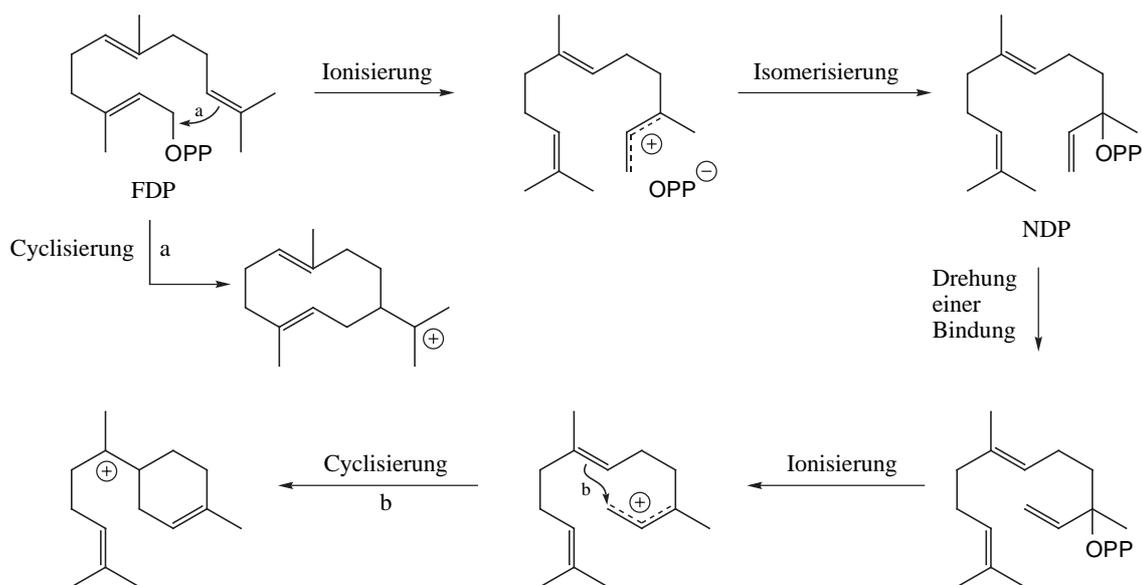
Abb. 13 FDP-Biosynthese.

### 3.2.3 Sesquiterpen-Synthasen

Die Biosynthese der Sesquiterpene wird durch Synthasen katalysiert (auch Sesquiterpen-Cyclasen genannt), die Farnesyldiphosphat (FDP) als Substrat benötigen. Treibende Kraft der Reaktion ist die Freisetzung einer Diphosphat-Gruppe<sup>[19,42]</sup>.

Erster Schritt der Synthese ist die Ionisierung von FDP durch Abspaltung von Diphosphat. Das resultierende allylische Kation wird elektrophil von der zentralen oder distalen Doppelbindung angegriffen, um ein ringförmiges Kation zu bilden (z.B. einen 10- oder 11-gliedrigen Ring mit ausschließlich trans-ständigen Doppelbindungen). Anschließend werden diverse kationische Transformationen am Molekül vorgenommen (Umlagerungen, Cyclisierungen, Hydrid-Shifts, Methyl-Migrationen etc.), um letztlich die positive Ladung in Form eines Protons abzuspalten. Zwar werden sämtliche Transformationen am Kation enzymatisch katalysiert, dennoch unterliegen die Reaktionen thermodynamischen Gesetzen. Somit müssen sämtliche  $\pi$ -Orbitale, die z.B. an einem Hydrid-Shift beteiligt sind, in einer geeigneten Geometrie zueinander stehen. Daher wurde auch beobachtet, daß bestimmte initiale Cyclisierungen geometrisch nicht möglich sind. Dazu gehört die Bildung von 10- und 11-gliedrigen Ringen mit cis-ständigen Bindungen und die Bildung von Sechsringen. Da aber dennoch entsprechende Intermediate auftreten, wurde ein weiterer Schritt vor der initialen Cyclisierung für solche Intermediate postuliert. Es handelt sich dabei um die Isomerisierung von FDP zu Nerolidyldiphosphat (NDP). Abb. 14 zeigt die möglichen initialen Schritte und zwei Cyclisierungsbeispiele (a und b).

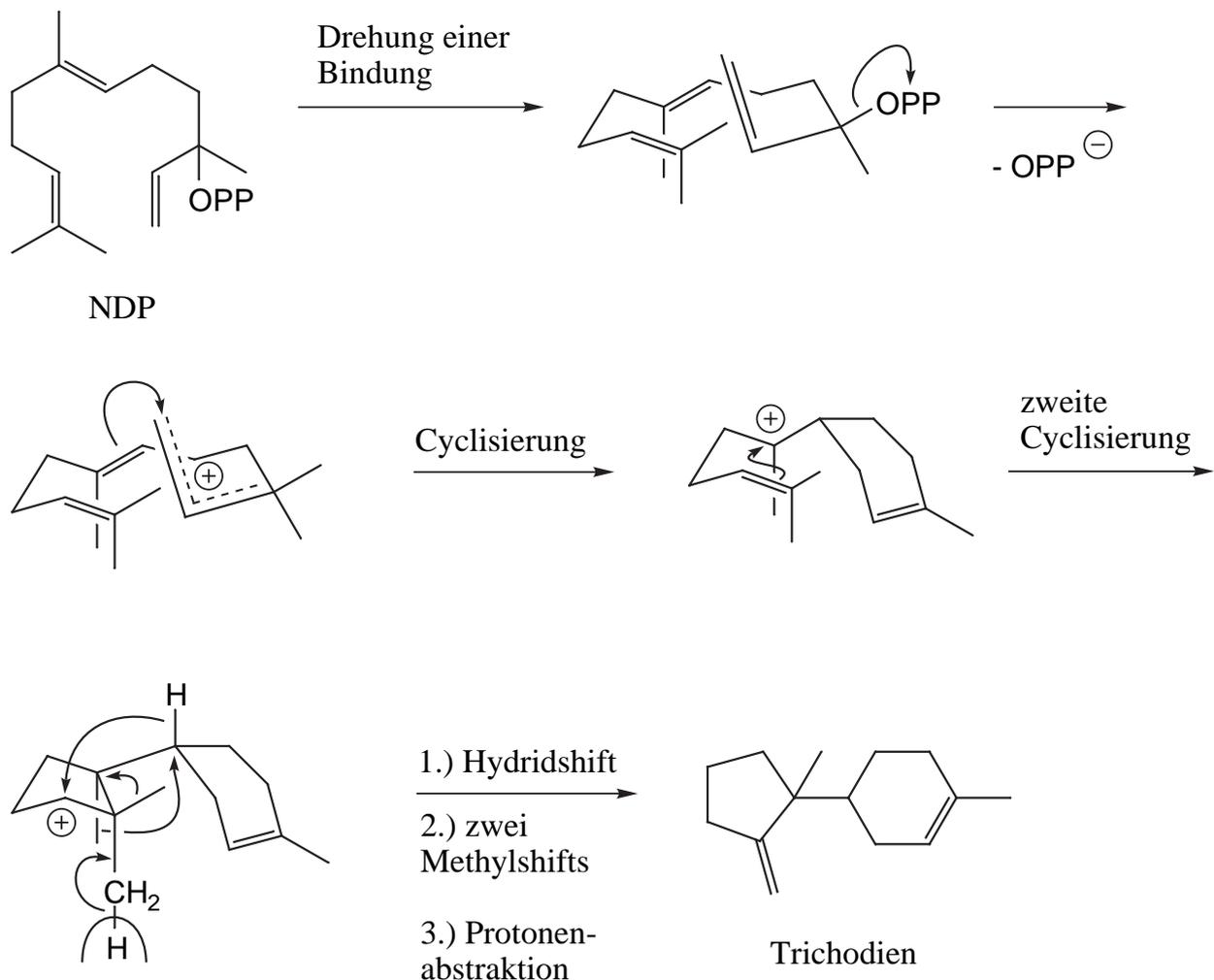
Durch mechanistische Überlegungen kann somit hergeleitet werden, ob für die Biosynthese eines bestimmten Sesquiterpens NDP oder FDP für die initiale Cyclisierung benötigt wird.



**Abb. 14** Initiale Cyclisierungen von FDP und NDP.

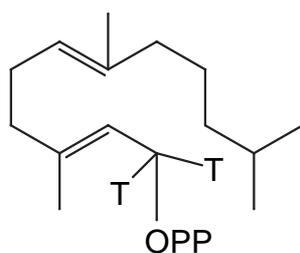
Mittlerweile sind die Mechanismen einiger Sesquiterpen-Synthesen aufgeklärt. Ein Beispiel, das die Vielfalt involvierter Reaktionen veranschaulicht, ist die Trichodien-Synthese, die aus dem Schimmelpilz *Trichothecium roseum* isoliert wurde<sup>[43]</sup>. Abb. 15 zeigt die einzelnen Schritte der Trichodien-Biosynthese.

Die Struktur von Trichodien besitzt einen Sechsring, somit ist es wahrscheinlich, das FDP vor der ersten Cyclisierung zu NDP isomerisiert wird. Markierungsexperimente, die deuteriertes FDP als Substrat verwendeten, konnten diese Vermutung bestätigen. Nach der Erzeugung eines allylischen Kations erfolgen zwei Cyclisierungen die zur Ausbildung eines Fünf- und eines Sechsrings führen. Danach folgt ein Hydrid-Shift und elektrophile Migration von zwei Methylgruppen. Abschließend erfolgt das Quenchen der positiven Ladung durch Abstraktion eines Protons.



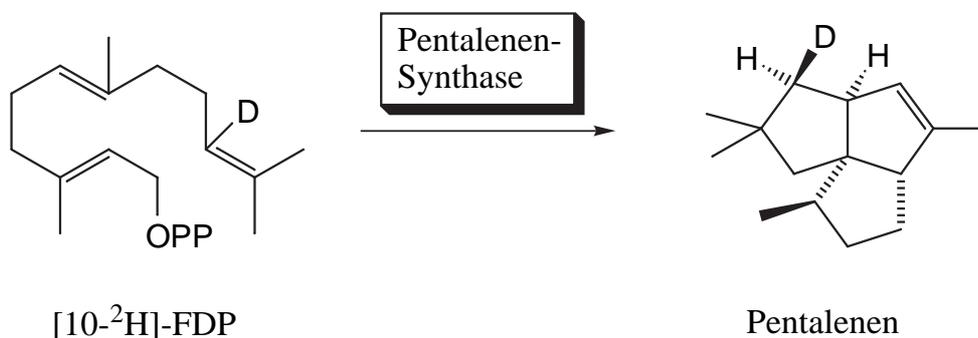
**Abb. 15** Biosynthese von Trichodien.

Die Aufklärung der komplizierten Einzelschritte dieser Synthese erfolgte mit Hilfe isotopenmarkierter Substrate (Abb. 16)<sup>[44]</sup>.

1,1-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>-FDP**Abb. 16** Struktur von tritiiertem FDP.

Der Vorteil einer solchen Markierung liegt darin, daß eine Synthese ohne Probleme dieses Substrat verwenden kann und bei der Synthese ein markiertes Produkt entsteht. Bis weit in die 80iger Jahre wurden für Isotopenmarkierungen meist tritiierte Substrate verwendet. Da die Position von Tritium nicht direkt im Zielmolekül bestimmt werden kann, waren aufwendige chemische Abbauprozesse nötig, um ein Molekül in Fragmente zu spalten. Diese Fragmente wurden dann auf Radioaktivität untersucht, um die Markierungsposition zu bestimmen. Neben der in Abb. 16 gezeigten Verwendung von Tritium als Marker, hat sich auch die Verwendung von <sup>14</sup>C-markierten Substraten bewährt. Zur Aufklärung des Trichodien-Cyclisierungsmechanismus<sup>4</sup> wurden neben 1,1-<sup>3</sup>H<sub>2</sub>-FDP auch noch (1*S*)- und (1*R*)-[1-<sup>3</sup>H,12,13-<sup>14</sup>C]-FDP verwendet. Zum Beweis der NDP Zwischenstufe wurde (1*Z*)-[1-<sup>3</sup>H,12,13-<sup>14</sup>C]-NDP verwendet<sup>45</sup>. Die Verwendung von enantioselektiv markierten Substraten gibt fernerhin Zugang zur Aufklärung des stereochemischen Verlaufs einer Cyclisierung.

Auf ähnlichem Wege wurden die Cyclisierungsmechanismen von Bisabolon<sup>46</sup>, Bergamoten<sup>47</sup>, Humulen- und Caryophyllen-Synthase<sup>4</sup> aufgeklärt. Der Cyclisierungsmechanismus von Pentalenen-Synthase wurde sowohl mit radioaktiv markierten Substraten, als auch mit deuterierten Substraten analysiert<sup>9,48</sup>. Der Vorteil deuterierten Substanzen liegt in der Möglichkeit, die synthetisierten Sesquiterpene per Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie analysieren können, um Marker-Positionen zu bestimmen. Somit entfallen aufwendige Abbaureaktionen. Im Falle des Pentalenen wurde u.a. [10-<sup>2</sup>H]-FDP an die Synthese verfüttert (Abb. 17) und markiertes Pentalenen mit Hilfe von <sup>2</sup>H-NMR-Spektroskopie analysiert.

[10-<sup>2</sup>H]-FDP

Pentalenen

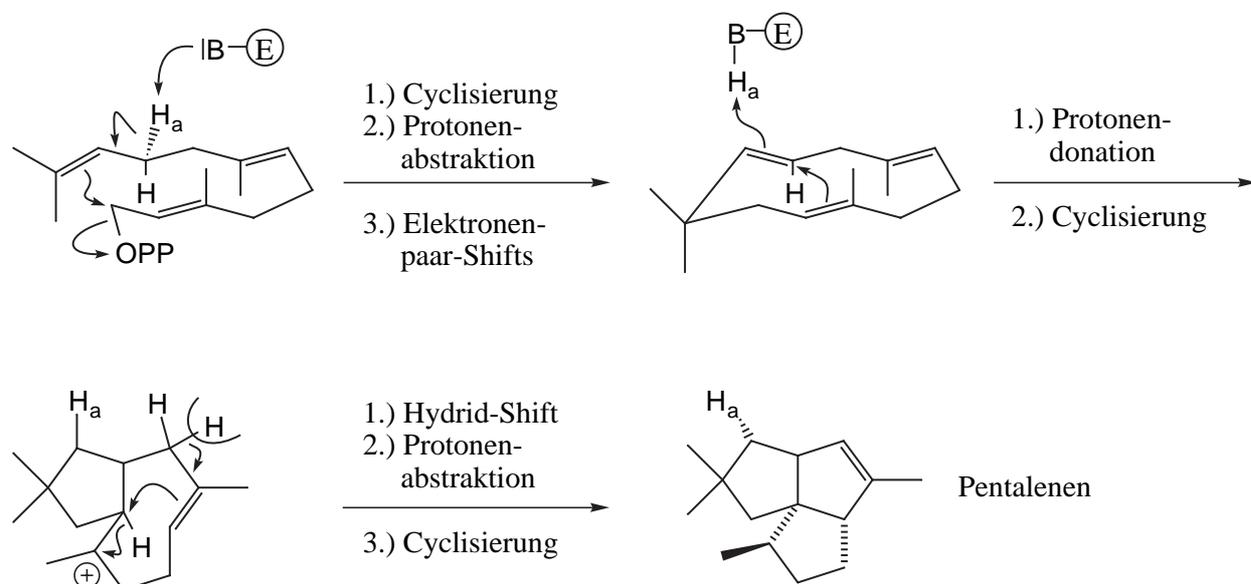
**Abb. 17** Umsetzung von [10-<sup>2</sup>H]-FDP zu Pentalenen.

Da die chemischen Verschiebungen im <sup>1</sup>H-NMR und <sup>2</sup>H-NMR nahezu identisch sind, kann ein Resonanzsignal im <sup>2</sup>H-NMR sofort einem entsprechenden Signal im <sup>1</sup>H-NMR

zugeordnet werden. Wurde zuvor eine Zuordnung aller  $^1\text{H}$ -NMR-Signale für unmarkiertes Pentalenen vorgenommen, so ist es möglich die Position des  $^2\text{H}$  im markierten Pentalenen problemlos ausfindig zu machen. Abb. 17 macht deutlich, daß sich die  $^2\text{H}$ -Markierung an einer Position befindet, die nur per NMR-Spektroskopie zugeordnet werden kann. Markierungen mit  $^3\text{H}$  und nachfolgende Abbaureaktionen könnten kein vergleichbares Ergebnis liefern.

Zur Aufklärung der gesamten Pentalenen-Biosynthese wurden insgesamt fünf verschiedene Substrate benutzt. Neben  $^2\text{H}$ -,  $^3\text{H}$ - und  $^{14}\text{C}$ -Markierungen wurde auch  $^{13}\text{C}$  als Marker verwendet. Der Verbleib von  $^{13}\text{C}$  in Pentalenen wurde durch Vergleich der  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von markiertem und unmarkiertem Pentalenen ermittelt, da im Spektrum der markierten Verbindung ein Signal eine wesentlich höhere Intensität besitzt als im unmarkiertem Spektrum.

Abb. 18 zeigt alle Schritte der Pentalenen-Biosynthese.



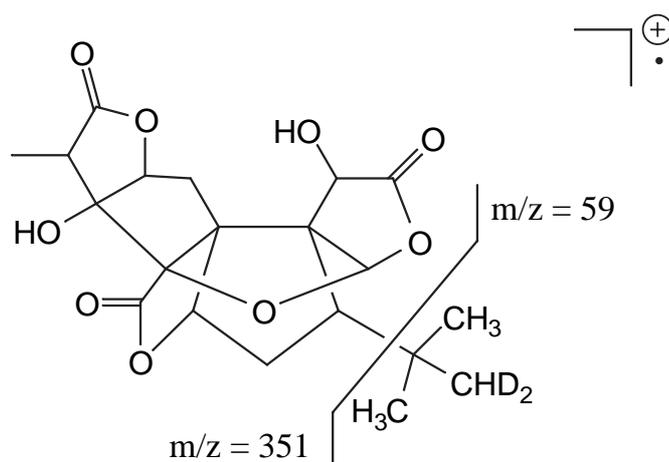
**Abb. 18** Pentalenen-Biosynthese.

Da im ersten Schritt der Pentalenen-Synthese ein 11-Ring mit ausschließlich trans-ständigen Doppelbindungen ausgebildet wird, ist FDP und nicht NDP das Substrat. Neben den schon erwähnten typischen Cyclisierungen, Protonenabstraktionen und Hydrid-Shifts, fallen zwei Besonderheiten bei der Pentalenen-Synthese auf. Einerseits wird ein ungeladenes Intermediat gebildet, das während der Reaktion am aktiven Zentrum des Enzyms verbleibt und nicht freigesetzt wird und außerdem agiert eine Aminosäure der Synthase als Protonendonator. Es wird deutlich, welche Vielzahl von Reaktionen am aktiven Zentrum von Synthasen realisiert werden können.

Ebenfalls mit Hilfe von deuterierten FDP-Substraten wurde die Biosynthese von Aristolochen aufgeklärt. Aristolochen-Synthase, die u.a. aus *Penicillium roquefortii* isoliert werden konnte<sup>[49]</sup>, wurde mit deuterierten Substraten wie (1S)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP inkubiert und markiertes Aristolochen per <sup>2</sup>H-NMR-Spektroskopie analysiert<sup>[50]</sup>.

Bei der Verwendung von deuterierten Substraten können die Syntheseprodukte alternativ auch mittels Massenspektrometrie untersucht werden. Dies hat gegenüber der NMR-Spektroskopie den Vorteil, daß geringere Substanzmengen benötigt werden, da die Massenspektrometrie wesentlich empfindlicher ist als die <sup>2</sup>H-NMR-Spektroskopie.

Ein Beispiel ist die Ginkgolid-A-Biosynthese. Verwendung des deuterierten Substrates [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Glucose lieferte markiertes Ginkgolid A mit einem Molekülpeak von  $m/z = 410$  im Massenspektrum anstelle von  $m/z = 408$  im Spektrum der unmarkierten Verbindung. Damit war der Einbau zweier Deuterium-Atome bewiesen. Ihre Position konnte durch Betrachtung des Fragmentierungsschemas bestimmt werden. Während im Spektrum der unmarkierten Verbindung der Basispeak bei  $m/z = 57$  beobachtet wird (Abspaltung der *tert*-Butylgruppe), liegt er bei markiertem Ginkgolid A bei  $m/z = 59$ . Dies entspricht der Abspaltung einer zweifach deuterierten *tert*-Butylgruppe (Abb. 19)<sup>[23]</sup>.



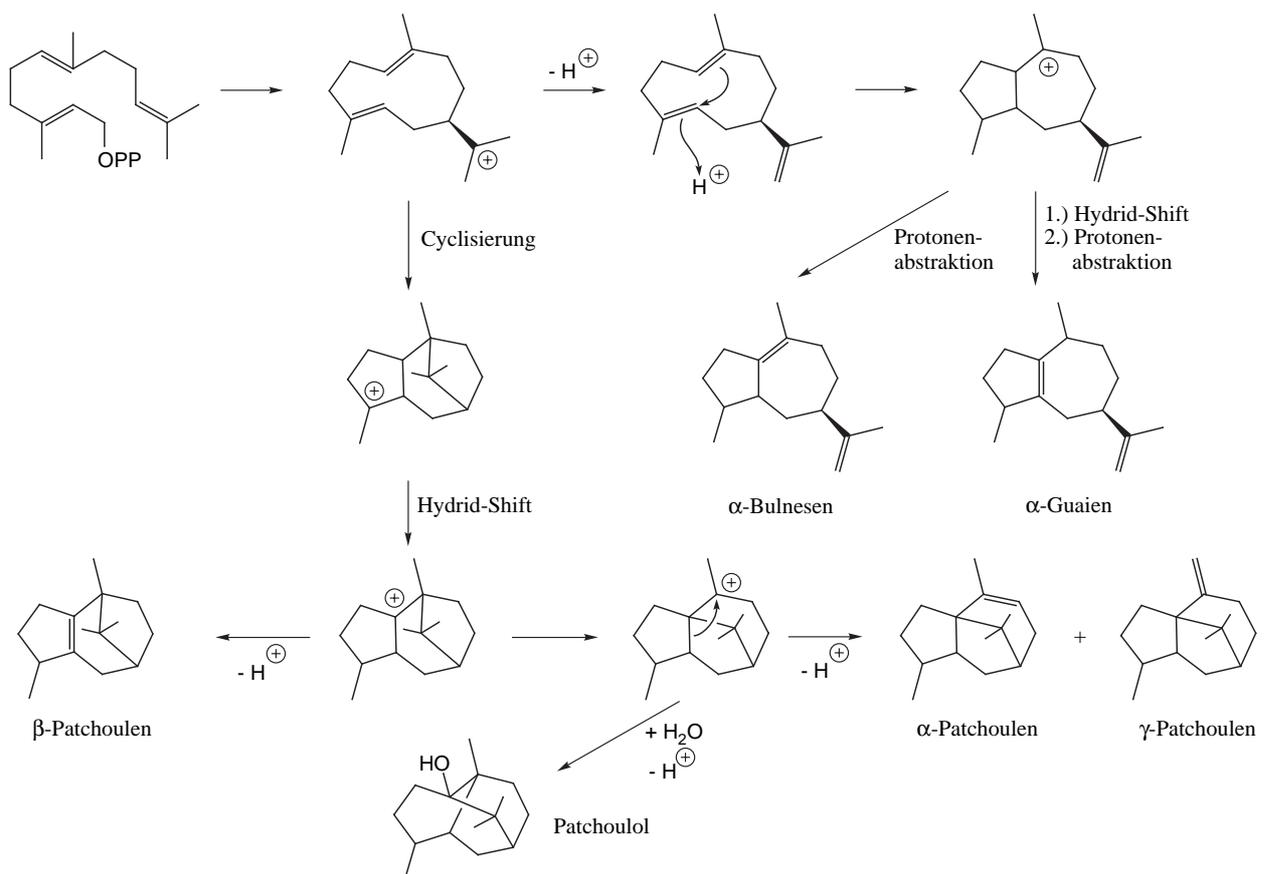
**Abb. 19** Struktur von Ginkgolid A und Fragmentierungsschema im Massenspektrum.

Die Verwendung von deuterierten Substraten mit nachfolgender Produktanalytik mittels Massenspektrometrie zur Bestimmung der Deuterium-Position findet sich auch in der Biosyntheseanalytik von Fettsäuren<sup>[51]</sup>.

Ein weiteres wichtiges Beispiel für Cyclisierungsmechanismen von Sesquiterpen-Synthasen ist die Patchoulol-Synthase<sup>[52]</sup>. Neben der Synthese des Sesquiterpenalkohols Patchoulol wird durch diese Synthase außerdem eine Anzahl von Sesquiterpenkohlenwasserstoffen synthetisiert. Dieses Phänomen wird als „leaky Synthase“ oder auch „Multi-Produkt-Synthase“ bezeichnet<sup>[53]</sup>. Die Strukturen der „Nebenprodukte“ ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, und  $\gamma$ -Patchoulen,  $\alpha$ -Bulnesen und  $\alpha$ -Guaien) legen die Vermutung nahe, daß die Verbindun-

gen aus kationischen Intermediaten der Patchouliol-Biosynthese resultieren. Abb. 20 zeigt den Cyclisierungsmechanismus von FDP zu Patchouliol und die dabei entstehenden Nebenprodukte.

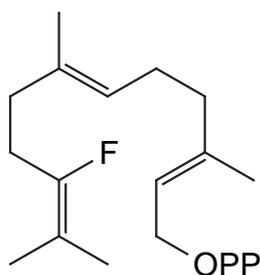
Auch wenn die in Abb. 20 gezeigte Sequenz das Auftreten sämtlicher Nebenprodukte hinreichend erklärt, bleibt die Frage, warum einzelne Synthesen kationische Intermediate „verlieren“ können, die dann im wässrigen Medium des Cytosols zu Nebenprodukten weiterreagieren. Bei dem eingangs erwähnten Beispiel der Trichodien-Synthese entstehen ebenfalls eine Reihe kationischer Intermediate, die allerdings permanent am Enzym gebunden bleiben, so daß keinerlei Nebenprodukte beobachtet werden. Mittlerweile wurde das Phänomen der Multi-Produkt-Synthese auch bei Germacren-C-<sup>[54]</sup>,  $\delta$ -Selinen-<sup>[55]</sup> und  $\gamma$ -Humulen-Synthase<sup>[55]</sup> beobachtet. Bei diesen Synthesen wurden zusätzlich auch die entsprechenden cDNA-Sequenzen der Enzyme isoliert, so daß in Zukunft eventuell mehr Informationen über die Ursachen der schwachen Bindung bestimmter Kationen an eine Multi-Produkt-Synthese erhalten werden können.



**Abb. 20** Biosynthese von Patchouliol.

An dieser Stelle soll auch kurz auf einen gänzlich anderen Weg der Mechanismus-Aufklärung eingegangen werden. Ansatz dafür ist die Überlegung, mit Synthase-Inhibitoren

zu arbeiten, die unter geeigneten Umständen als „Suizid-Substrate“ das aktive Zentrum eines Enzyms irreversibel blockieren. Dazu werden die Synthasen mit Substrat-Analoga inkubiert, bei denen bestimmte Protonen durch Fluor bzw. Sauerstoff durch Schwefel substituiert ist. Wird an einer Stelle der Cyclisierung normalerweise ein Proton abstrahiert, so ist dies bei einer Fluorsubstitution ausgeschlossen, da die Bildung von  $F^+$  ausgeschlossen ist. Das gebildete Kation verbleibt somit irreversibel am Enzym und inhibiert es. Ein Beispiel ist die Inhibierung der Trichodien-Synthase mit dem Substrat-Analoga 10-Fluoro-FDP (Abb. 21)<sup>[56]</sup>.



**Abb. 21** Struktur des Trichodien Synthase Inhibitors 10-Fluoro-FDP.

Zusätzlich ermöglichen solche Substrate auch die Durchführung detaillierter kinetischer Studien.

Die irreversible Bindung von Inhibitoren ermöglicht zusätzlich kristallographische Analysen des Enzyms, die zur Identifizierung des aktiven Zentrums genutzt werden können. Auf diesem Wege wurde der Cyclisierungsmechanismus von 5-*epi*-Aristolochen-Synthase aufgeklärt und gleichzeitig das aktive Zentrum der Synthase charakterisiert<sup>[57]</sup>.

Die biochemische Charakterisierung von Sesquiterpen-Synthasen zeigt weitgehend identische Eigenschaften der Synthasen. Ihre Molmasse liegt im Bereich zwischen 40 und 100 kDa und sämtliche bisher charakterisierten Synthasen bestehen aus einer oder zwei Untereinheiten. Synthasen benötigen stets ein divalentes Metallkation als Co-Faktor, wobei  $Mg^{2+}$  für diesen Zweck am geeignetsten ist, in einigen Fällen aber auch durch  $Mn^{2+}$  substituiert werden kann. Substrat ist jeweils (*E,E*)-FDP, das in einigen Fällen (s.o.) durch NDP ersetzt werden kann. Es wurden allerdings auch Fälle berichtet, in denen (*2Z, 6E*)-FDP als Substrat für Sesquiterpen-Synthasen dient<sup>[58]</sup>.

Kinetische Studien zeigen, daß Sesquiterpen-Synthasen der Michaelis-Menten-Kinetik folgen. Die Michaelis-Menten-Kinetik<sup>[59]</sup> geht von der Annahme aus, daß ein Enzym-Substrat-Komplex ES aus dem Substrat S und dem Enzym E gebildet wird. Für die Hinreaktion wird eine Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  angenommen und für die Rückreaktion  $k_{-1}$ . Anschließend zerfällt der Enzym-Substrat-Komplex in das Produkt P und Enzym E mit der Geschwindigkeitskonstante  $k_2$ :



Diese Annahme gilt in guter Näherung für alle enzymkatalysierten Reaktionen, bei denen nur ein Substrat vorhanden ist. Diese Voraussetzung ist bei Sesquiterpen-Synthasen gegeben.

Die Michaelis-Menten-Gleichung lautet:

$$v_0 = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Mit den Konstanten:  $v_0$  = Reaktionsgeschwindigkeit

$V_{\max} = k_2 [E]$  = Maximalgeschwindigkeit bei Substratsättigung

$[E]$  = Enzymkonzentration

$[S]$  = Substratkonzentration

$K_M$  = Michaelis-Menten-Konstante

Die Michaelis-Menten-Konstante ist somit definiert als

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$$

Es gehört damit zur Standard-Charakterisierung einer Sesquiterpen-Synthase, ihren  $K_M$ -Wert für das Substrat FDP zu bestimmen. Gewöhnlich liegt der  $K_M$ -Wert bei einer Substrat-Konzentration zwischen 0.1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ .

Letztlich sollte für eine vollständige Charakterisierung auch ein pH-Optimum der Synthase ermittelt werden. Gewöhnlich liegt es zwischen pH 6 und pH 8, allerdings besitzen die meisten Sesquiterpen-Synthasen eine hohe Toleranz gegenüber höheren oder niedrigeren pH-Werten, d.h. sie verlieren nur wenig ihrer Aktivität zwischen pH 5 und pH 9.

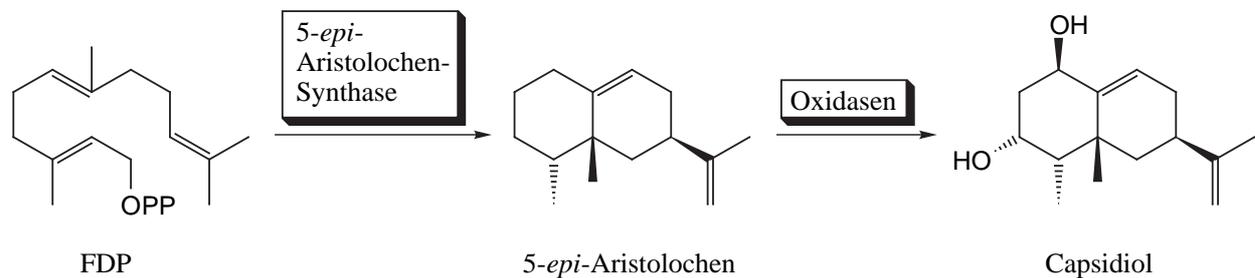
In manchen Fällen ist es sinnvoll, zusätzlich ein Temperaturoptimum zu bestimmen (z.B. in Fällen geringer Enzymaktivität). Im Durchschnitt liegt das Temperaturoptimum für Sesquiterpen-Synthasen bei 30°C bis 35°C.

### 3.2.4 Ziel der Sesquiterpen-Biosynthese

Es stellt sich die Frage, warum diverse Organismen Sesquiterpene synthetisieren. Es wurden zwar etliche für den Menschen interessante Eigenschaften von Sesquiterpenen berichtet, u.a. ihr Aroma (siehe auch Kapitel 1.1 Sesquiterpene), auf den Nutzen der Sesquiterpene für die sie produzierenden Organismen wurde allerdings erst in den 90iger Jahren näher eingegangen.

Heute wird davon ausgegangen, daß Sekundärmetabolite wie Sesquiterpene u.a. bei Angriffen von Pathogenen als Phytoalexine produziert werden<sup>[60]</sup>. Phytoalexine minimieren das Eindringen von Pathogenen (Pilze, Bakterien) in das Zellgewebe und halten somit den Schaden für die Pflanzen gering. Ein bekanntes Beispiel für ein Phytoalexin ist Capsidiol, ein Sesquiterpenalkohol. Capsidiol wird in einer zweistufigen Biosynthese aus

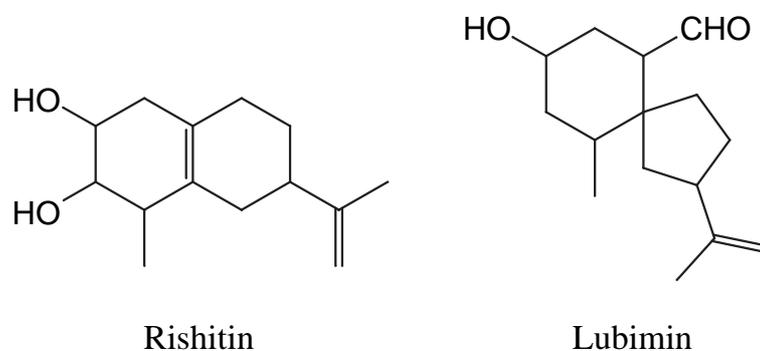
FDP gebildet. Zunächst wird aus FDP *5-epi-Aristolochene* gebildet, daß dann durch Oxidasen zu Capsidiol oxidiert wird (Abb. 22).



**Abb. 22** Biosynthese von Capsidiol.

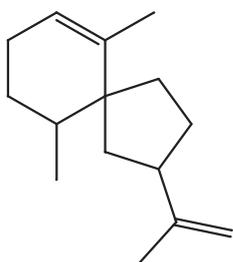
In Chili-Pfeffer und Tabakpflanzen<sup>[61]</sup> konnte eine vermehrte Produktion des Phytoalexins Capsidiol beobachtet werden, nachdem die Pflanzen einem Pilzbefall ausgesetzt waren. Analog wurde auch eine erhöhte *5-epi-Aristolochene-Synthase*-Aktivität gemessen. Dies gilt als Beweis, daß die Synthese von *5-epi-Aristolochene* der erste Schritt der Capsidiol-Biosynthese ist.

Durch Stimulation mit Arachidonsäure konnten Zellkulturen der Kartoffelpflanze zu vermehrter Produktion von Lubimin und Rishitin (Abb. 23) angeregt werden<sup>[6]</sup>.



**Abb. 23** Strukturen von Rishitin und Lubimin.

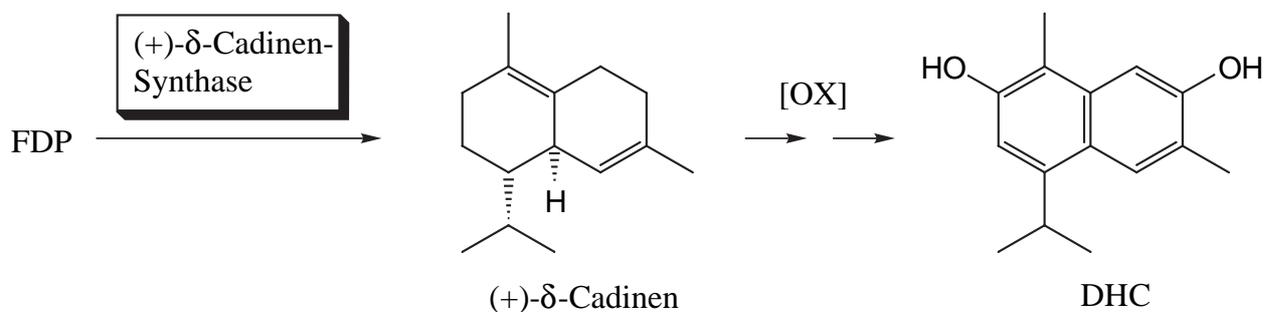
Es wird vermutet, daß der erste Schritt der Lubimin-Biosynthese die Bildung von Vetispiradien (Abb. 24) ist, das dann sukzessive zu Lubimin oxidiert wird<sup>[6]</sup>.



**Abb. 24** Struktur von Vetispiradien.

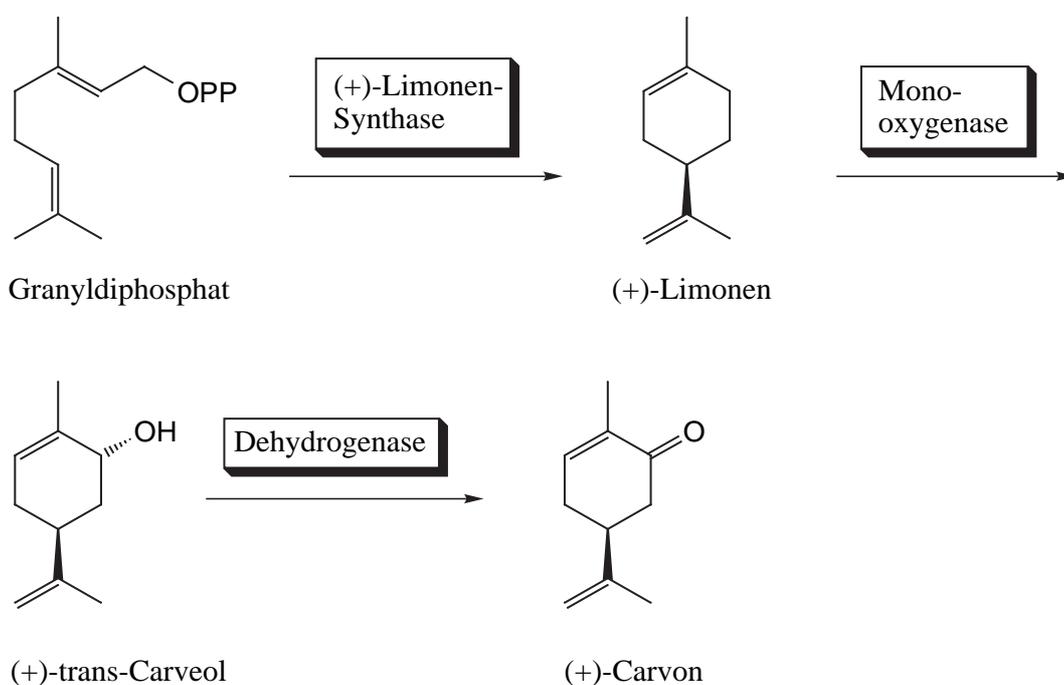
Bei Baumwollpflanzen konnte bewiesen werden, daß das Phytoalexin 2,7-Dihydroxycadalen (DHC) antibakterielle Aktivität zeigt. Vor

allem gegen den typischen Befall von Baumwollpflanzen durch das Bakterium *Xanthomonas campestris* pv. *malvacearum* (Smith) zeigte DHC eine gute Wirkung. Erster Schritt der DHC-Biosynthese ist die Synthese des Sesquiterpens (+)- $\delta$ -Cadinen (Abb. 25)<sup>[62]</sup>.



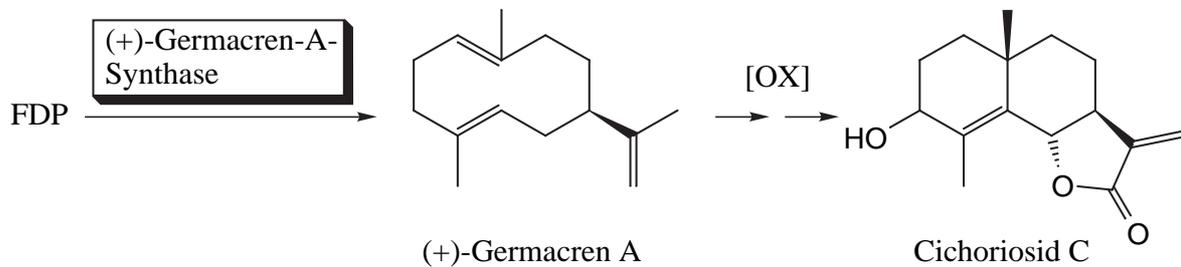
**Abb. 25** Biosynthese des Phytoalexins 2,7-Dihydroxycadalen (DHC).

Mittlerweile werden auch Enzyme untersucht, die Oxidationen von Sesquiterpenen katalysieren. An dieser Stelle sei die Oxidation des Monoterpens (+)-Limonen zu dem Monoterpenalkohol (+)-trans-Carveol durch eine Monooxygenase erwähnt<sup>[63]</sup>. Die Monooxygenase besitzt an ihrem aktiven Zentrum eine Cytochrom P-450-Einheit, die als Oxidationsmittel  $O_2$  verwendet und ein Sauerstoffatom in eine C-H-Bindung insertiert. Benötigt wird außerdem NADPH als Co-Faktor<sup>[64]</sup>. Mit Hilfe einer Dehydrogenase wird (+)-trans-Carveol zu dem Monoterpenketon (+)-Carvon oxidiert (Abb. 26)<sup>[65]</sup>.



**Abb. 26** Biosynthese von Carvon.

Neueste Untersuchungen beschäftigen sich mit der Identifizierung entsprechender Monoxygenasen und Dehydrogenasen für Sesquiterpene. Ein Beispiel ist die Biosynthese von Sesquiterpenlactonen aus Germacren A (u.a. Cichoriosid C, Abb. 27)<sup>[66]</sup> aus Zichorie Pflanzen.



**Abb. 27** Postulierte Biosynthese von Cichoriosid C.

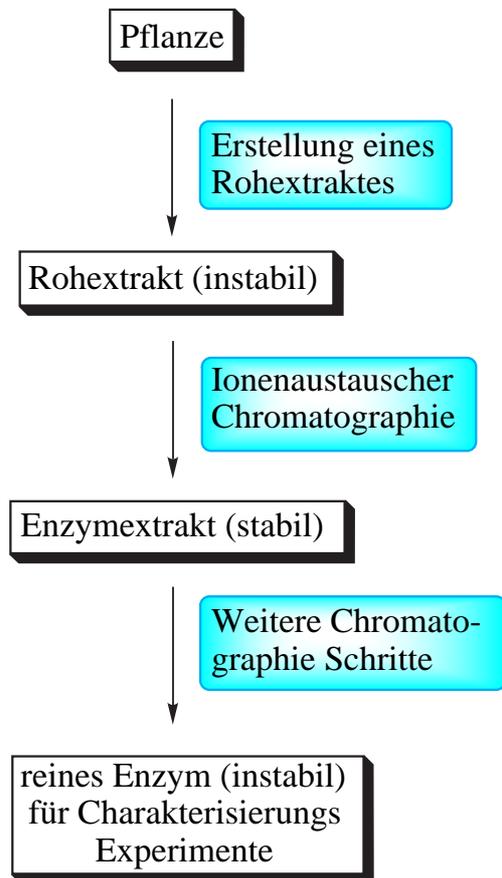
Ziel solcher Untersuchungen ist es, bestimmte Enzyme der Sesquiterpenlacton-Biosynthese selektiv zu inhibieren, um die Lacton-Produktion zu unterbinden. Sesquiterpenlactone in Zichorie haben den Nachteil einen bitteren Geschmack zu verursachen, wodurch die Pflanze für die Verfütterung an Nutztiere ungeeignet ist.

### 3.3 Methoden der Enzymisolierung

Ein zentraler Aspekt der Biosynthese-Analytik ist die Isolierung involvierter Enzyme. Dabei ist zu beachten, daß Enzyme außerhalb ihrer natürlichen Umgebung extrem instabil sind und zur Denaturierung neigen. Zuerst muß daher ein Medium zur „Lagerung“ der Enzyme gefunden werden. Bewährt haben sich für diesen Zweck Pufferlösungen mit einem optimalen pH-Wert, die zusätzlich Antioxidantien (Dithiothreitol,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ , Ascorbinsäure) enthalten<sup>[67]</sup>. Fernerhin können Puffer auch Co-Faktoren der entsprechenden Enzyme beinhalten. Zur Erhöhung der Stabilität von Enzympräparationen ist das Entfernen von phenolischen Komponenten und Proteasen essentiell. In solcher Form können Enzympräparationen auch für einen längeren Zeitraum (einige Monate) bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert werden ohne ihre Aktivität zu verlieren. Zusätzliche Enzyme (außer Proteasen) erhöhen gewöhnlich die Stabilität von Enzymextrakten, somit sind Enzympräparationen, die nur noch ein isoliertes Enzym enthalten, gewöhnlich sehr instabil. Dieses Problem kann durch Zugabe von Rinder-Serumalbumin (BSA) umgangen werden, wodurch allerdings die Möglichkeit ein Enzym zu charakterisieren beeinträchtigt wird. In solchen Fällen hilft oftmals nur, die Reinigung des Enzyms direkt vor der Charakterisierung vorzunehmen und möglichst schnell zu arbeiten, um den Aktivitätsverlust des Enzyms in tolerablen Grenzen zu halten<sup>[68]</sup>.

Zur weiteren Aktivitätserhöhung eines Enzyms kann die Verwendung von Detergenzien wie Tween 20 dienen.

Das typische Vorgehen für die Isolierung eines Enzyms aus einer Pflanze wird schematisch in Abb. 28 wiedergegeben.



**Abb. 28** Schematische Darstellung einer Enzymisolierung.

Während der Erstellung des Rohextraktes werden Polyvinylpolypyrrolidon (PVPP) und XAD-4 Polystyrol hinzugefügt, um Phenole und andere niedermolekulare Verbindungen aus dem Extrakt zu entfernen. Der instabile Rohextrakt wird nach einer Zentrifugation (um Zellreste zu entfernen) sofort einem ersten Reinigungsschritt unterworfen (z.B. einer Ionenaustauscher-Chromatographie), um Reste von Phenolen und störende Proteasen zu entfernen. Sollten auf diesem Weg nicht alle Proteasen entfernt werden können, so müssen dem Extrakt Protease-Inhibitoren zugesetzt werden. EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) und PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) sind typische Protease-Inhibitoren, ihr Nachteil liegt in ihrer hohen Toxizität. Der erhaltene Enzymextrakt ist zwar stabil, zeigt aber u.U. nur eine geringe Aktivität des gesuchten Enzyms. Ursache dafür ist meist das

Vorhandensein von Enzymen, die um das gleiche Substrat konkurrieren. Ein Beispiel sind Phosphohydrolasen, die das Substrat FDP desphosphorylieren, so daß es Sesquiterpen-Synthasen nicht mehr zur Verfügung steht. In diesem Fall wird eine hohe Farnesol Konzentration und eine geringe Sesquiterpenkonzentration in Assays gemessen. Abhilfe schaffen Phosphohydrolaseninhibitoren wie Vanadat- und Molybdat-Salze<sup>[69]</sup>. Der Enzymextrakt wird dann weiteren Chromatographie-Schritten unterworfen, um letztlich die biochemischen Eigenschaften des reinen Enzyms bestimmen zu können (Charakterisierungsexperimente: pH-Optimum, Bestimmung der molaren Masse, Temperaturoptimum, kinetische Studien).

Tab. 1 gibt eine Übersicht über die verschiedenen Chromatographie-Methoden zur Reinigung von Enzymen.

In einigen Fällen können auch mehrere Chromatographie-Schritte derselben Art kombiniert werden, bei denen nur die Beschaffenheit der stationären Phase geändert wird. Ein

gängiges Beispiel ist die Kombination zweier Anionenaustauscher-Schritte, zuerst mit DEAE-Cellulose und nachfolgend mit einer MonoQ Phase<sup>[70]</sup>.

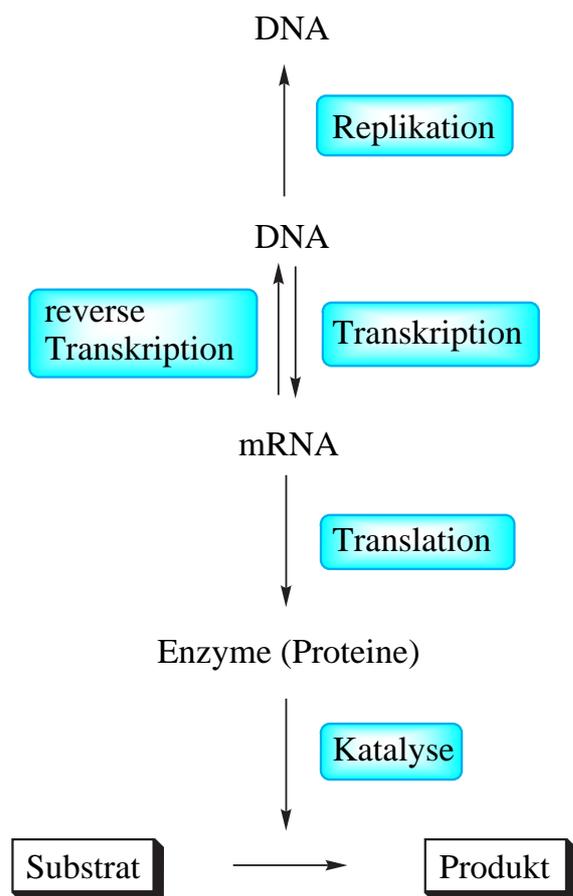
Methoden	Stationäre Phase	Trennprinzip
Anionenaustauscher-Chromatographie <sup>[69]</sup>	Quervernetzte Cellulose oder Agarose mit ionischen Substituenten (z.B. NR <sub>3</sub> <sup>+</sup> ) an Spacern	Trennung von Enzymen mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (pI)
Gelfiltration <sup>[69]</sup>	Quervernetzte Agarose ohne Ladungen	Trennung von Enzymen mit unterschiedlicher Molmasse
Hydroxylapatit-Chromatographie <sup>[69]</sup>	Kristallines Calciumphosphat	Ionische Wechselwirkungen zwischen Ca <sup>2+</sup> und Carboxylgruppen der Proteine
Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie <sup>[71]</sup>	Quervernetzte Agarose mit hydrophoben Liganden (langkettige Ether etc.)	Hydrophobe Interaktionen zwischen Trennphase und Proteinen führen zur Entfernung der H <sub>2</sub> O-Hülle des Proteins und zu einer Entropie-Erhöhung. Diese variiert bei verschiedenen Proteinen
Dye-Liganden-Chromatographie <sup>[69]</sup>	Quervernetzte Agarose mit Triazinderivaten als Substituenten	Bisher nicht geklärt
Gel-Elektrophorese und isoelektrische Fokussierung <sup>[68]</sup>	Polyacrylamidgel mit variablen pH-Werten	Trennung von Proteinen mit unterschiedlicher Ladung und Molmasse

**Tab. 1** Methoden der Protein-Chromatographie.

Abschließend seien noch Techniken zur Proteinreinigung erwähnt, die nicht in die Kategorie der Chromatographie fallen. Dazu gehören Präzipitations-Techniken, die selektiv durch sukzessive Zugabe von Ammoniumsulfat (AMS-Präzipitation) oder anderen Salzen Proteine aus einer Lösung ausfällen. Fernerhin sind Ultrazentrifugation, Dialyse und Ultrafiltration gebräuchlich<sup>[59]</sup>.

### 3.4 Molekularbiologie der Sesquiterpen-Synthasen

Dem zentralen Dogma der Molekularbiologie<sup>[72]</sup> zu Folge wird die Erbinformation von Enzymen in der DNA codiert. Durch Transkription der DNA wird mRNA (messenger RNA) erstellt und durch Translation der mRNA an den Ribosomen werden letztlich Enzyme und andere Proteine synthetisiert (Abb. 29).



**Abb. 29** Zentrales Dogma der Molekularbiologie.

Diesem Schema zufolge müßte es möglich sein, die genetische Erbinformation von Sesquiterpen-Synthasen zu erhalten. Tatsächlich gelang es, cDNA von Sesquiterpen-Synthasen zu isolieren. Dafür hat sich folgendes Vorgehen etabliert: zunächst wird die Gesamtheit der Pflanzen-mRNA mit Primern gescreent, die eine für Terpen-Synthasen typische Basensequenz enthalten<sup>[73]</sup>. Mittels PCR (Polymerase-Chain-Reaction) und reverser Transkriptasen (RT-PCR) werden einige Teilstücke der Synthasen-mRNA in einen DNA Strang umgeschrieben und vervielfältigt. Im nächsten Schritt wird eine cDNA-Bibliothek des gesamten Pflanzengenoms angelegt und mit den Teilstücken der Synthasen-DNA gescreent, um komplette Gene zu isolieren<sup>[74]</sup>. Solche

Gene werden letztlich in das Genom von *Escherichia coli* eingebaut und von den Bakterien exprimiert<sup>[75]</sup>. Auf diese Weise ist es möglich, die entsprechenden Synthasen bzw. ihre Reaktionsprodukte (die Sesquiterpene) in großer Menge und hoher Reinheit zu produzieren<sup>[76]</sup>. Die Syntheseprodukte stehen dann in genügend großer Menge NMR-spektroskopischen Untersuchungen zur Verfügung. Die isolierten Synthasen können außerdem kristallographisch analysiert werden, um zusätzliche Informationen über ihr aktives Zentrum und ihre dreidimensionale Struktur zu erhalten<sup>[57]</sup>.

## 4 Spezieller Teil

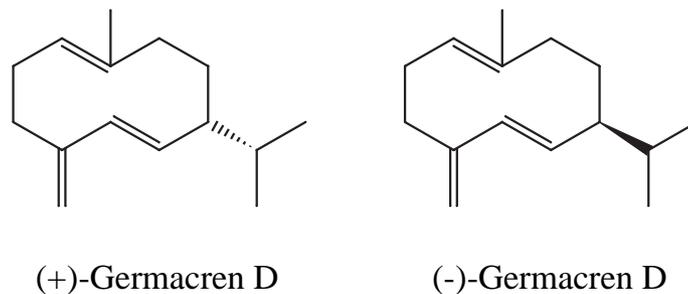
### 4.1 Überblick

Im Verlaufe der vorliegenden Arbeit wurde die Biosynthese der Sesquiterpene (+)-Germacren D, (-)-Germacren D und (-)- $\alpha$ -Gurjunen in der Pflanze *Solidago canadensis* (Goldrute) aufgeklärt. Der folgende Abschnitt beschäftigt sich mit den einzelnen Schritten, die zur Bewältigung der gestellten Aufgabe nötig waren.

In Kapitel 4.2 wird auf die Wahl der untersuchten Pflanze eingegangen. Kapitel 4.3 beschreibt die Isolierung der gesuchten Enzyme und Kapitel 4.4 ihre biochemische Charakterisierung. Kapitel 4.5 beschäftigt sich mit der Synthese deuterierter Substrate und Kapitel 4.6 geht auf die Aufklärung der Biosynthese-Mechanismen ein. Abschließend werden in Kapitel 4.7 Überlegungen zur Biosynthese von Cyclocoloronon angestellt.

### 4.2 Die Pflanze *Solidago canadensis* und ihre Inhaltsstoffe

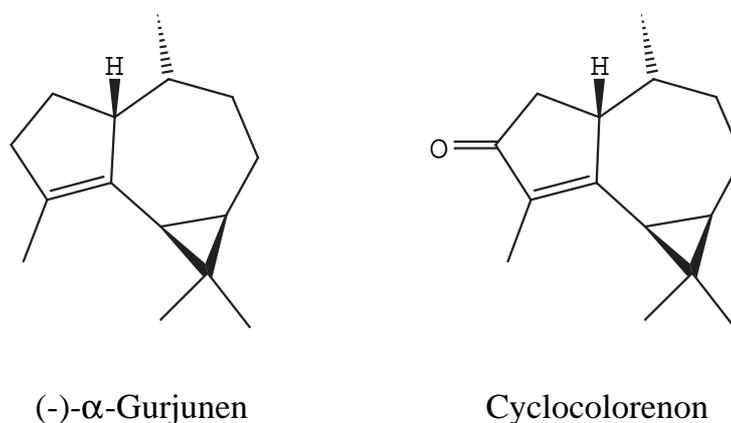
Da in der Literatur bisher nur unzureichend auf die Biosynthese von Sesquiterpen-Enantiomeren eingegangen wurde, sollte diese nun am Beispiel von (+)- und (-)-Germacren D (Abb. 30) untersucht werden.



**Abb. 30** Strukturen von (+)- und (-)-Germacren D.

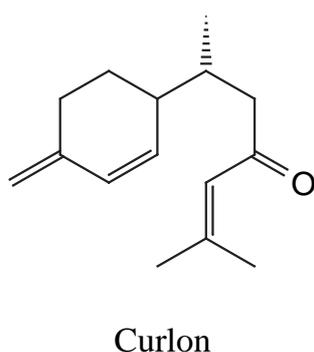
Gewöhnlich wird (+)-Germacren D in dem ätherischen Öl einiger niederer Pflanzen<sup>[77]</sup> und in Lebermoosen gefunden<sup>[78]</sup>, während (-)-Germacren D von verschiedenen höheren Pflanzenarten (*Asteraceae*, *Simaroubaceae* und *Magnoliaceae*) synthetisiert wird<sup>[79]</sup>. Eine interessante Ausnahme dieser Regel wurde erstmals in den 80iger Jahren für die höhere Pflanze *Solidago altissima* L. berichtet<sup>[18]</sup>. Beide Germacren D-Enantiomere konnten in

dem ätherischen Öl der Pflanze in ähnlichen Mengen nachgewiesen werden. Mittlerweile wurden ähnliche Ergebnisse auch für andere *Solidago* Arten erhalten (*S. canadensis* und *S. gigantea*)<sup>[80]</sup>. Somit stellt die in Mitteleuropa heimische *S. canadensis* ein ideales Forschungsobjekt dar. Sie bietet die einmalige Möglichkeit, gleichzeitig die Biosynthese zweier Enantiomere aufzuklären. Außerdem wurde in ihrem ätherischen Öl größere Mengen des Sesquiterpenketons Cyclocoloranon nachgewiesen. In Kombination mit dem Resultat, daß auch geringere Mengen des strukturell verwandten (-)- $\alpha$ -Gurjunen (Abb. 31) im ätherischen Öl vorhanden sind, stellte sich die Frage, ob beide Verbindungen biogenetisch miteinander verknüpft sind. Auch diese Fragestellung konnte mit Hilfe von *S. canadensis* beantwortet werden.



**Abb. 31** Strukturen von (-)- $\alpha$ -Gurjunen und Cyclocoloranon.

Germacren D und Cyclocoloranon sind die Hauptkomponenten des ätherischen Öls von *S. canadensis*. Fernerhin sind in größeren Mengen die Monoterpene Limonen und  $\alpha$ -Pinen vertreten. Die Zusammensetzung des Öls variiert stark in Abhängigkeit vom Herkunftsort der Pflanze<sup>[30]</sup>. Während im Norddeutschen Raum Germacren D und Cyclocoloranon die Hauptkomponenten der Pflanze sind, wurde in polnischen *S. canadensis* Pflanzen Curlon ( $\beta$ -Sesquiphellandren-9-on) als Hauptkomponente identifiziert (Abb. 32)<sup>[81]</sup>.

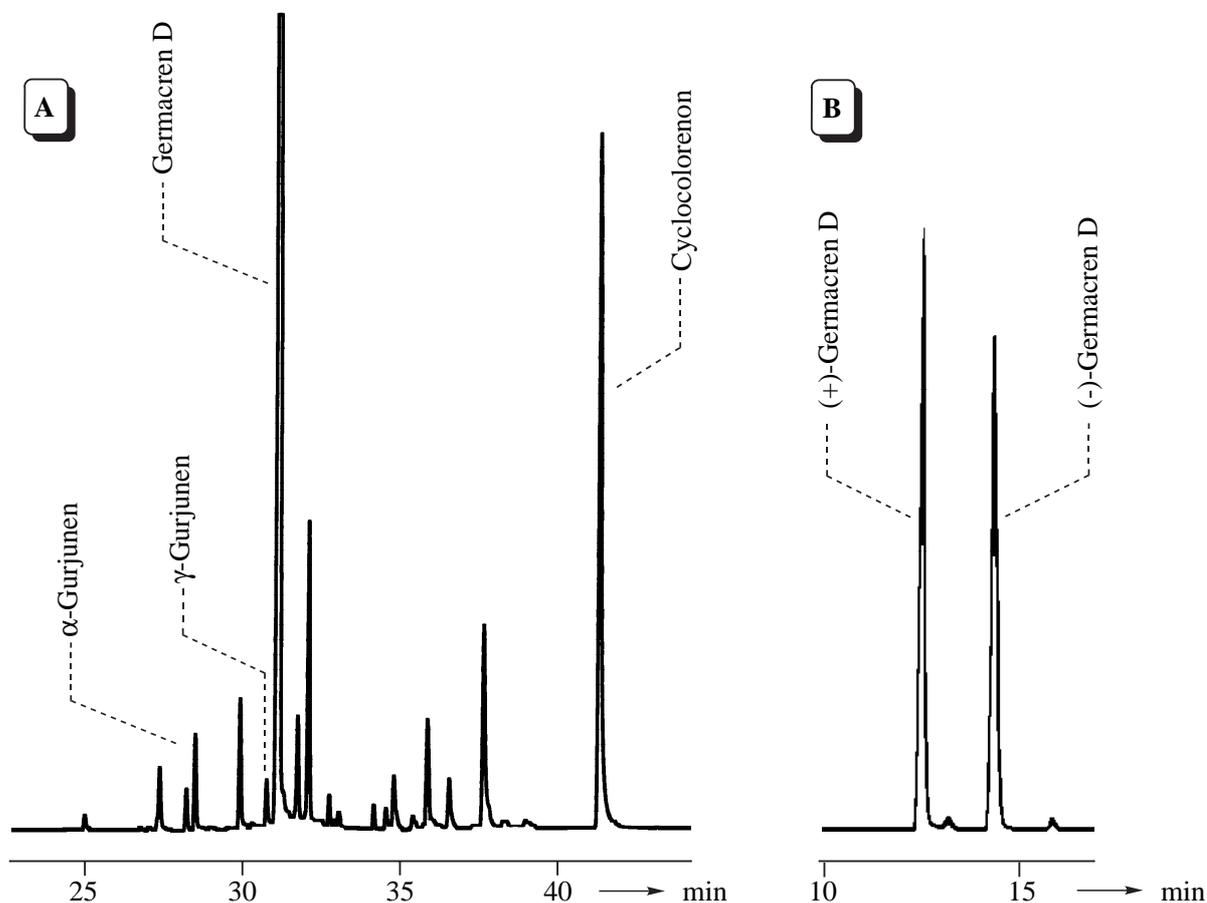


**Abb. 32** Struktur von Curlon.

In Norddeutschen Pflanzen konnte Curlon hingegen nicht nachgewiesen werden, umgekehrt wurde kein Cyclocoloranon in polnischen Pflanzen gefunden. Um die Biogenese von Cyclocoloranon aufzuklären, fiel somit die Wahl auf die in Norddeutschland vorkommenden *S. canadensis* Pflanzen.

Abb. 33A zeigt die gaschromatographische Analyse des äthe-

rischen Öls von *S. canadensis* (gesammelt in der Nähe von Hamburg). Dieses Pflanzenmaterial wurde im Verlauf der vorliegenden Dissertation für sämtliche Experimente benutzt.



**Abb. 33** GC-Analyse des *S. canadensis* Extraktes. A: Analyse des Gesamt-Öls (CP-Sil-5CB-Phase, 50°C → 230°C, 3°C/min); B: Analyse des enthaltenen Germacren D an einer chiralen GC-Phase (6T-2,3-Me-β-CD-Phase, 120°C isotherm). Es wurden nur diejenigen Verbindungen beschriftet, die im Verlauf der vorliegenden Dissertation untersucht wurden.

Da es sich bei Germacren D um die Hauptkomponente von *S. canadensis* handelt, war seine Isolierung mittels präparativer Gaschromatographie leicht möglich. Der so isolierte Germacren D-Standard konnte einer GC-Analyse mit chiraler stationärer Phase (6T-2,3-Me-β-CD) unterzogen werden (Abb. 33B). Wie bereits von der Literatur postuliert<sup>[18]</sup>, konnten beide Germacren D-Enantiomere in vergleichbaren Mengen detektiert werden. Allerdings kann das Enantiomerenverhältnis je nach Fundort und Zeitpunkt der Sammlung variieren<sup>[30]</sup>. Für die im Verlaufe dieser Dissertation durchgeführten Experimente

wurden Pflanzen mit einem Enantiomerenverhältnis von (+)/(-)-Germacren D 3:1 bis 1:9 verwendet.

*Solidago canadensis*, auch kanadische Goldrute genannt, läßt sich wie folgt in die botanische Systematik einordnen<sup>[82]</sup>:

<b>Familie</b>	Korbblütler (Compositae, Stamm Asteraceae)
<b>Unterfamilie</b>	Asteroideae
<b>Tribus</b>	Astereae
<b>Subtribus</b>	Solidagininae
<b>Gattung</b>	<i>Solidago</i> L.
<b>Art</b>	<i>Solidago canadensis</i>



**Abb. 34** Skizze von *S. canadensis*.

Bei *S. canadensis* handelt es sich um eine ausdauernde Pflanze mit gelber Blüte, die ursprünglich in Nordamerika beheimatet war. Mittlerweile ist sie auch in Mitteleuropa stark verbreitet, wo sie in einer Vielzahl schwach differenzierter Varietäten („Lokalrassen“) auftritt. Dies erklärt auch das Phänomen der wechselnden Zusammensetzung ihres ätherischen Öls in Abhängigkeit vom Fundort. Abb. 34 zeigt die Skizze einer *S. canadensis*-Pflanze<sup>[83]</sup>.

Die Pflanze findet auch in der Heilkunde Anwendung. Die während der Blüte gesammelten und getrockneten oberirdischen Teile werden als „Solidaginis-herba“ bezeichnet und in Form von Aufgüssen (Kräutertee) verabreicht. Der

Droge wird eine diuretische (Förderung der Ausscheidungen), schwach spasmolytische (krampflösende) und antiphlogistische (entzündungshemmende) Wirkung zuerkannt<sup>[82,84]</sup>. Goldrutentee wird verabreicht bei Blasen- und Nierenentzündung, sowie bei Harnsteinen und Nierengrieß<sup>[85]</sup>. Außerdem wird berichtet, daß das ätherische Öl verschiedener *Soli-*

*dago*-Arten toxisch auf *Sitophilus granarius* (Kornkäfer) wirkt und *Tribolium confusum* (amerikanischer Reismehlkäfer) abschreckt<sup>[81]</sup>.

Die Hauptkomponente Germacren D besitzt ebenfalls weitreichende biologische Aktivität. Es wirkt stimulierend auf die Fortpflanzung der amerikanischen Küchenschabe (*Periplaneta americana* L. und *P. japonica* Karny)<sup>[86]</sup>. Außerdem stimuliert es die Eiablage einiger Mottenarten (*Diaphania nitidalis* Stoll.)<sup>[79]</sup> und spielt eine Rolle bei der Erkennung der Wirtspflanze durch Kartoffelkäfer (*Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824)<sup>[87]</sup>. Die biologischen Aktivitäten wurden u.a. durch Aufnahme von Elektroantennogrammen (EAG) gemessen. Hierzu werden die Antennenfühler von Insekten über Elektroden mit einem computergesteuerten Meßsystem verbunden, um Stimulationen elektronisch zu visualisieren<sup>[88]</sup>. Zusätzlich spielt Germacren D eine zentrale Rolle als Intermediat in der Biosynthese zahlreicher Sesquiterpene mit Cadinan- und Bourbonan-Grundgerüst<sup>[89]</sup>.

(-)- $\alpha$ -Gurjunen ist Bestandteil des Patchouli-Öls (*Pogostemon cablin* Benth.)<sup>[90]</sup> und wird von verschiedenen *Dipterocarpus*-Arten in größeren Mengen synthetisiert<sup>[91]</sup>. Es ist die Hauptkomponente des Gurjun-Balsam-Öls, das als Fixierungskomponente in Parfums verwendet wird und als Ausgangsmaterial der Guaiazulen-Produktion dient<sup>[92]</sup>. Somit besitzt die Aufklärung der (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Biosynthese auch ein potentiell kommerzielles Interesse.

Cyclocolorenon konnte außer in *S. canadensis*<sup>[93]</sup> auch noch in *Pseudowintera colorata*<sup>[94]</sup> als Hauptkomponente identifiziert werden. Es besitzt phytotoxische und antimicrobielle Eigenschaften<sup>[95]</sup>.

## 4.3 Enzymisolierungen

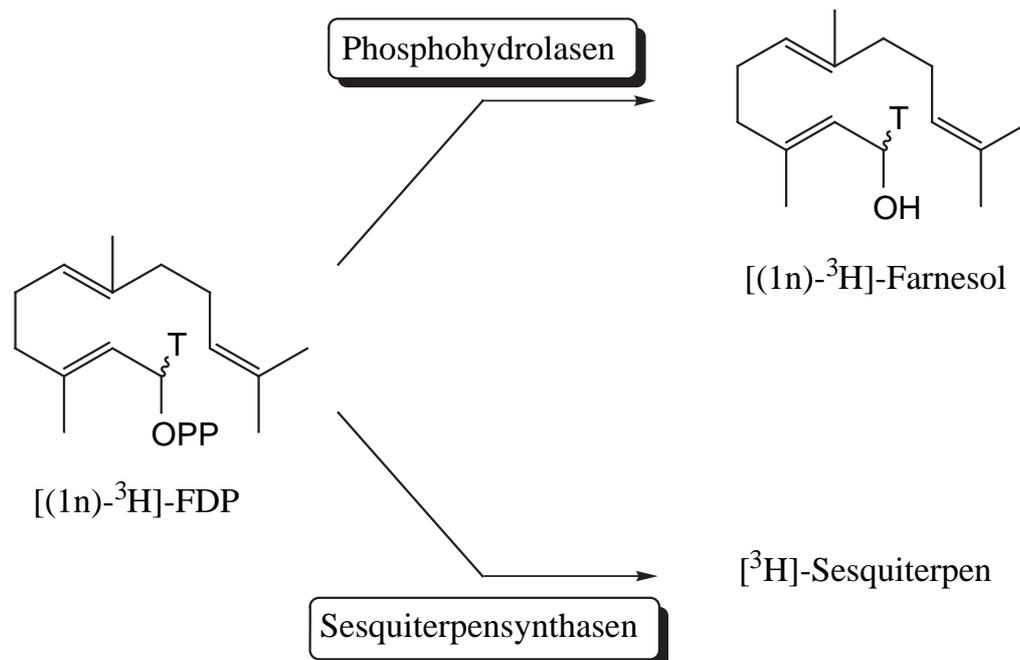
Für die Isolierung der (+)-Germacren-D-, (-)-Germacren-D- und (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthese wurde zunächst ein Assay-System entwickelt, daß eine schnelle und sichere Produktanalyse ermöglicht (Kapitel 4.3.1). Anschließend wurden die einzelnen Enzyme voneinander separiert (Kapitel 4.3.2 - 4.3.4).

### 4.3.1 Radiochemische Assays und Radio-Gaschromatographie

Da die gesuchten Synthesen aus Pflanzenmaterial isoliert werden mußten, waren jeweils mehrere Chromatographie-Schritte nötig, bis die Synthesen in reiner Form vorlagen. Nach jedem Chromatographie-Schritt mußten zwischen 30 und 60 verschiedene Fraktionen auf Synthese-Aktivität untersucht werden. Nur aktive Fraktionen sollten für weitere Reinigungsschritte oder Protein-Charakterisierungen genutzt werden. Da die Synthesen relativ instabil sind, war für die Bestimmung aktiver Fraktionen ein möglichst schnelles

Enzymassay nötig. Diese Voraussetzung erfüllt ein Assay, das mit radioaktiv markierten FDP (dem Substrat der gesuchten Enzyme) arbeitet<sup>[96]</sup>.

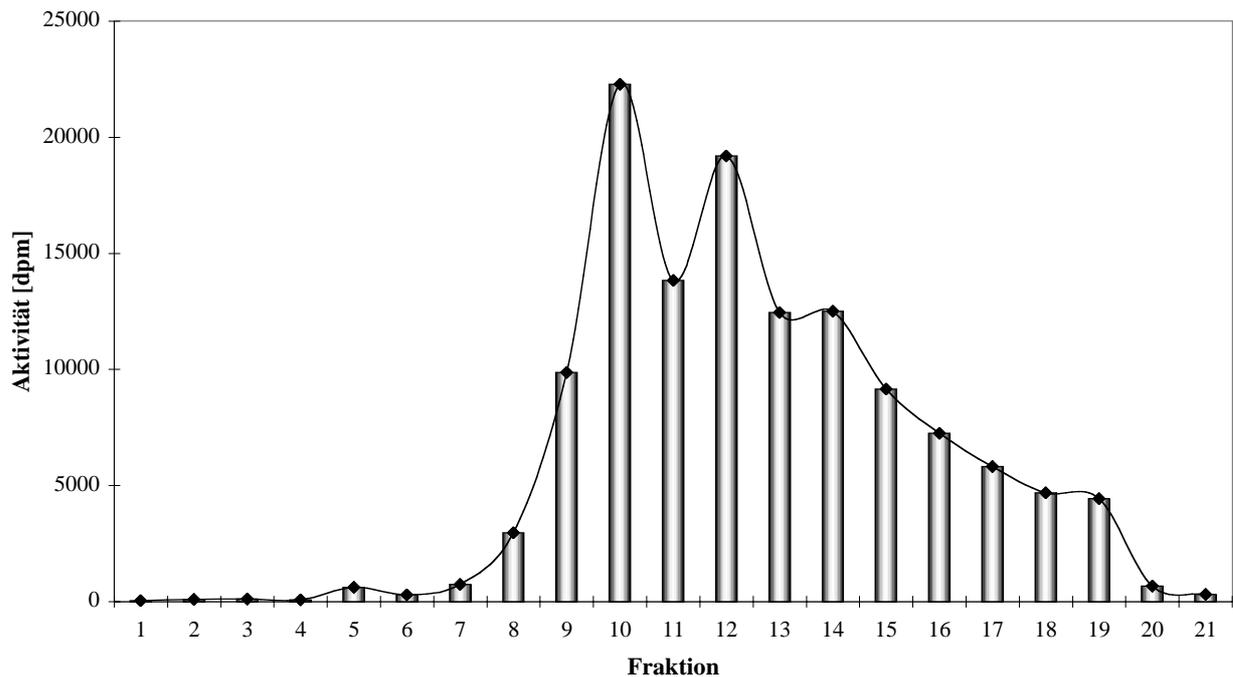
In einem sog. Microassay<sup>[66]</sup> wird eine kleine Menge (10- 20  $\mu$ l) der zu untersuchenden Fraktion mit Pufferlösung verdünnt und mit (1n)- $^3\text{H}$ -FDP versetzt. Anschließend wird die Mischung für 30 min inkubiert. Während des Assays können zwei verschiedene Reaktionen ablaufen (Abb. 35):



**Abb. 35** Mögliche Reaktionen in einem radioaktiven Enzymassay.

Es wird deutlich, daß nach der Inkubation drei Arten radioaktiv markierter Verbindungen vorliegen: nichtumgesetztes  $^3\text{H}$ -FDP,  $^3\text{H}$ -Farnesol und  $^3\text{H}$ -Sesquiterpene. Um nur Fraktionen zu detektieren, die  $^3\text{H}$ -Sesquiterpene enthalten, wird das wäßrige Assay mit Hexan ausgeschüttelt und die organische Phase anschließend über Kieselgel aufgereinigt.  $^3\text{H}$ -FDP bleibt in der wäßrigen Phase und  $^3\text{H}$ -Farnesol wird nicht vom Kieselgel eluiert, somit enthält die verbleibende Hexan-Phase ausschließlich  $^3\text{H}$ -Sesquiterpene. Diese Hexan-Phase wird abschließend auf Radioaktivität untersucht (Szintillationszähler). Assays, bei denen Radioaktivität detektiert wird, enthalten somit Sesquiterpen-Synthasen. Eine graphische Auftragung der gemessenen Radioaktivität zeigt deutlich welche Fraktionen gepoolt werden müssen (Abb. 36).

## Microassays nach DEAE Chromatographie



**Abb. 36** Graphische Auftragung der Microassay-Ergebnisse nach der Aufreinigung des Enzymrohextraktes aus *S. canadensis* über eine DEAE-Säule (Ausschnitt).

Sollten sich bei einer graphischen Auftragung mehrere Aktivitätspeaks zeigen, so ist dies ein Indiz für die Separation zweier verschiedener Sesquiterpen-Synthasen. In solchem Falle sollten die Fraktionen der verschiedenen Peaks getrennt voneinander gesammelt werden.

Nach den Microassays stehen die gepoolten Fraktionen weiteren Reinigungsschritten oder Charakterisierungsexperimenten zur Verfügung.

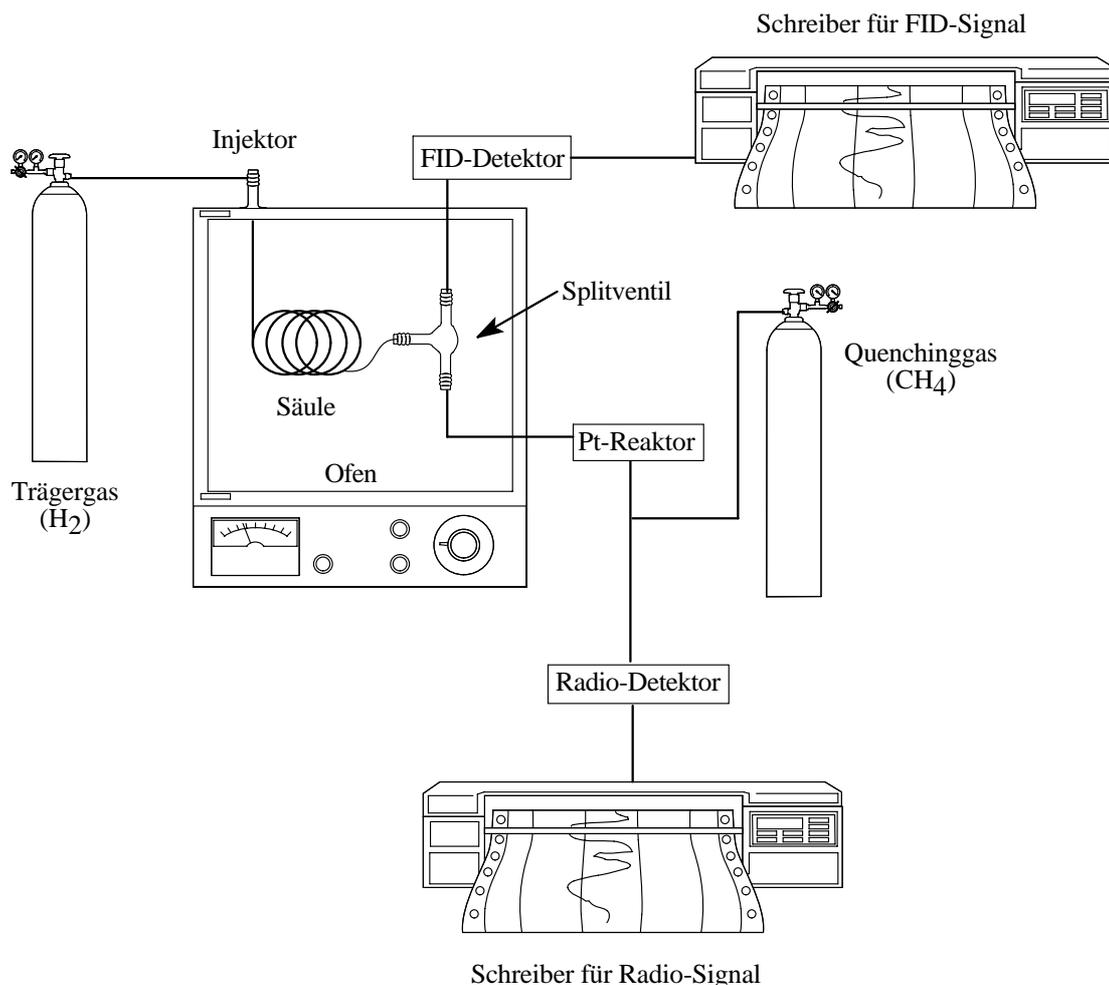
Microassays vermögen keine Auskunft darüber zu geben, welche Sesquiterpen-Synthase isoliert wurde, hierfür ist ein sog. Macroassay<sup>[68]</sup> geeigneter. Für ein Macroassay werden 0.5 – 3.0 ml Enzymextrakt benötigt, die – analog dem Microassay – mit [<sup>3</sup>H]-FDP inkubiert werden. Während der Inkubation laufen die gleichen Reaktionen ab, wie bei einem Microassay. Abschließend wird die wäßrige Phase mit Diethylether extrahiert. Die organische Phase wird mittels Radio-Gaschromatographie analysiert ([<sup>3</sup>H]-Farnesol wird bei Macroassays nicht abgetrennt, da gleichzeitig geprüft werden soll, ob die isolierte Synthase frei von kontaminierenden Phosphohydrolasen ist).

Die Radio-Gaschromatographie<sup>[97]</sup> besitzt gegenüber der herkömmlichen Gaschromatographie zwei Vorteile:

- Es werden ausschließlich radioaktiv markierte Produkte detektiert, d.h. es werden nur vom Enzymextrakt enzymatisch synthetisierte Produkte detektiert. Sesquiterpene, die von der Pflanze vor ihrer Extraktion produziert wurden („endogene“ Sesquiterpene) stören die Detektion nicht.
- Der an den Gaschromatographen angeschlossene Radioaktivitätsdetektor hat eine wesentlich höhere Empfindlichkeit (Substanzmengen  $< 1$  pmol können noch detektiert werden) als ein herkömmlicher FID. Dies ist besonders wichtig, da die synthetisierten Substanzmengen aus Enzymextrakten höherer Pflanzen sehr gering sind.

In dem Fall, daß keine endogenen Sesquiterpene im Enzymextrakt vorhanden sind, können auch Inkubationen mit unmarkiertem FDP vorgenommen werden mit anschließender Produktanalyse per GC-MS. Diese Methode liefert zwar genauere Ergebnisse über die Struktur der synthetisierten Sesquiterpene, ist allerdings wesentlich unempfindlicher als die Radio-Gaschromatographie.

Abb. 37 zeigt den schematischen Aufbau eines Radio-Gaschromatographen:

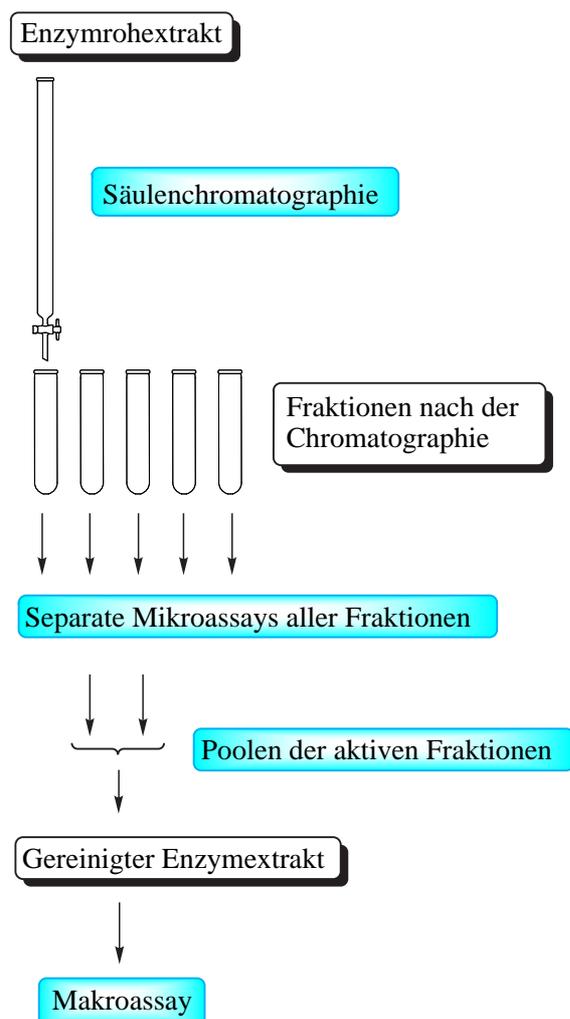


**Abb. 37** Prinzip der Radio-Gaschromatographie.

Der Aufbau des Radio-GCs gleicht dem eines gewöhnlichen GCs, allerdings besitzt er als Modifizierung ein Splitventil, das den Gasstrom hinter der Kapillarsäule einerseits zu einem FID und andererseits zu einem platinbeschichteten Reaktor leitet. In dem Reaktor werden organische Substanzen bei 800°C unter Pt-Katalyse und H<sub>2</sub>-Zugabe zu CH<sub>4</sub> reduziert. Bei Vorhandensein radioaktiver Komponenten entsteht CH<sub>3</sub><sup>3</sup>H, das im Radiodetektor detektiert wird. Um mögliche Beschädigungen des sehr empfindlichen Detektors auszuschließen, wird vor dem Reaktor noch Quenchinggas (CH<sub>4</sub>) zugefügt.

Allgemein stellt sich bei der Detektion von <sup>3</sup>H-markierten Verbindungen das Problem, daß <sup>3</sup>H nur ein sehr schwacher β-Strahler ist<sup>[98]</sup>. Dieses Problem kann durch die Messung der Substanzen in der Gasphase umgangen werden. Daher werden bei Radio-GC-Analysen sämtliche Verbindungen zunächst zu gasförmigem CH<sub>4</sub> reduziert. Eine andere Möglichkeit der Detektion besteht darin, die markierten Substanzen in einen „Szintillationscocktail“ aufzulösen und anschließend per Szintillationszähler zu detektieren. Diese Technik wird bei der Aktivitätsbestimmung von Microassays angewandt.

Abb. 38 gibt eine schematische Zusammenfassung für das Vorgehen bei einer Enzymisolierung.

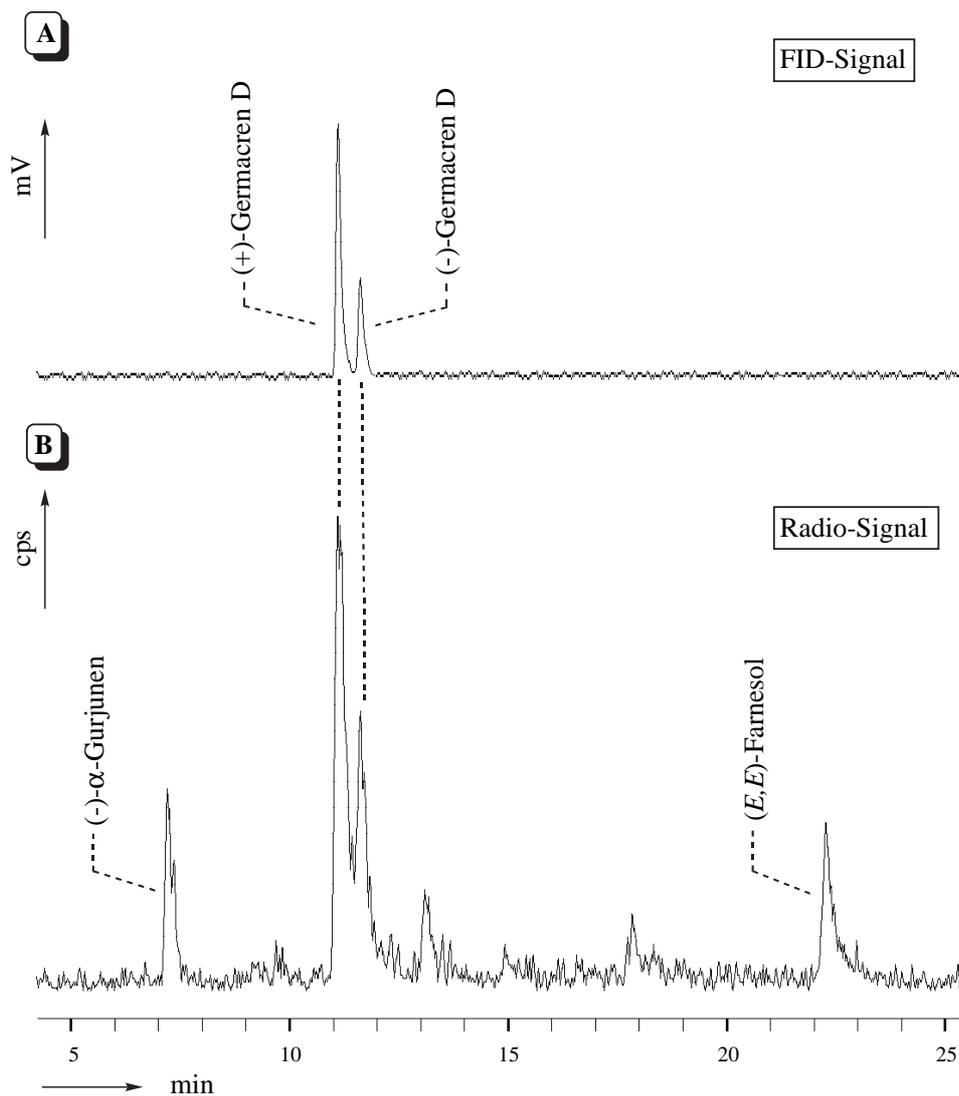


**Abb. 38** Schematische Enzymisolierung.

Der Enzymrohextrakt wird per Chromatographie gereinigt (siehe auch Kapitel 3.3). Dabei werden mehrere Enzymfraktionen getrennt aufgefangen. Jede dieser Fraktionen wird einer Aktivitätsanalyse unterworfen, die mit Hilfe von Microassays durchgeführt wird. So wird ermittelt, in welchen Fraktionen Sesquiterpen-Synthasen vorhanden sind. Aktive Fraktionen werden gepoolt und können dann in einem Macroassay analysiert werden, um festzustellen, welche Sesquiterpen-Synthase isoliert wurde. Außerdem steht der gereinigte Enzymextrakt weiteren Reinigungsschritten zur Verfügung.

### 4.3.2 Isolierung von (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase

Zur Isolierung der beiden gesuchten Synthasen<sup>[99]</sup> wurde zunächst ein Enzymrohextrakt erstellt. Dafür wurde das gefrorene Pflanzenmaterial in einem geeigneten Extraktionspuffer zermörsert und Reste der Zellwände durch Zentrifugation bei 20,000g entfernt (Details zu sämtlichen erwähnten Experimenten finden sich in Kapitel 7). Mittels Ultrazentrifugation bei 100,000g wurden anschließend microsomale Zellpartikel ausgefällt. Der so erhaltene Enzymrohextrakt wurde per Macroassay auf Synthase-Aktivität untersucht (siehe Kapitel 4.3.1 Radiochemische Assays und Radio-Gaschromatographie). Abb. 39 zeigt die Analyse des Assays per Radio-GC.



**Abb. 39** Radio-GC-Analyse von Macroassay-Produkten des Enzymrohextraktes (6T-2,3-Me- $\beta$ -CD; 116°C für 14 min mit 15°C/min  $\rightarrow$  170°C). A: FID Signal von unmarkierten Standards, die zur Peak-Identifizierung koinjiziert wurden. B: Radiosignale der enzymatisch produzierten Verbindungen.

Es werden eine Vielzahl radioaktiver Verbindungen detektiert. Damit stellte sich zunächst die Aufgabe, diese Substanzen zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurden Koinjektionen mit unmarkierten Sesquiterpen-Standards durchgeführt\*. Koeluiert ein Standard mit einer radioaktiven Verbindung, so werden gleichzeitige Signale im FID und im Radiodetektor registriert. In diesem Zusammenhang sei darauf hingewiesen, daß die Peakform von Radio-GC-Signalen im allgemeinen nicht so scharf ist, wie bei FID-Signalen<sup>[100]</sup>. Ursache ist die Radio-Detektion in der Gasphase, die zu einer Peakverbreiterung führt. Zusätzlich kann die Radio-Detektion zu ungewünschten Spikes führen†. Somit erfolgt eine Peakzuordnung am besten anhand des Peak-Schwerpunktes und nicht mit Hilfe der Peakspitzen.

Es wurden vier Hauptkomponenten identifiziert: (*E,E*)-Farnesol (das durch unspezifische Phosphohydrolasen-Aktivität aus FDP gebildet wird<sup>[68]</sup>), das Sesquiterpen (-)- $\alpha$ -Gurjunen und die gesuchten Sesquiterpene (+)- und (-)-Germacren D im Verhältnis 3:1. Dies entspricht dem Verhältnis, das für das ätherische Öl derselben Pflanze bestimmt wurde. Somit wäre zunächst bewiesen, daß beide Sesquiterpene enzymatisch gebildet werden. Entsprechende Kontrollinkubationen (d.h. das Assay wird vor der Zugabe von FDP für zwei Minuten auf 100°C erhitzt, um Enzyme zu denaturieren) zeigten keinerlei Germacren D-Bildung, somit ist eine willkürliche Synthese von Germacren D aus FDP unter Assaybedingungen ausgeschlossen.

Die nächste Aufgabe war nun, einzelne Enzyme aus dem Enzymrohextrakt zu isolieren. Da Stabilitätsexperimente zeigten, daß der Rohextrakt nach 2 h etwa die Hälfte seiner Aktivität verlor (bewiesen durch Microassays), mußte ein möglichst schneller erster Reinigungsschritt gefunden werden. Dafür boten sich Präzipitations-Techniken oder eine Anionenaustauscher-Chromatographie an. Da die Ionenaustauscher-Chromatographie an DEAE-Cellulose gute Ergebnisse lieferte, wurde dieser Schritt als erster Reinigungsschritt eingeführt.

Der Enzymrohextrakt wurde auf eine DEAE-Cellulose-Säule gegeben und die gebundenen Proteine mit einem KCl-Gradienten eluiert und fraktioniert aufgefangen. Microassays der einzelnen Fraktionen dienten zur Bestimmung der aktiven Fraktionen (siehe auch Abb. 36, Seite 41). Da sich keine deutliche Separation von Aktivitätspeaks in den Microassays zeigte (nur ein relativ breiter Peak), wurden sämtliche aktiven Fraktionen gepoolt. Nach der DEAE-Chromatographie befanden sich die aktiven Fraktionen in einem Elutions-Puffer mit einer Konzentration von etwa 0.2 M KCl. Kaliumchlorid reduziert

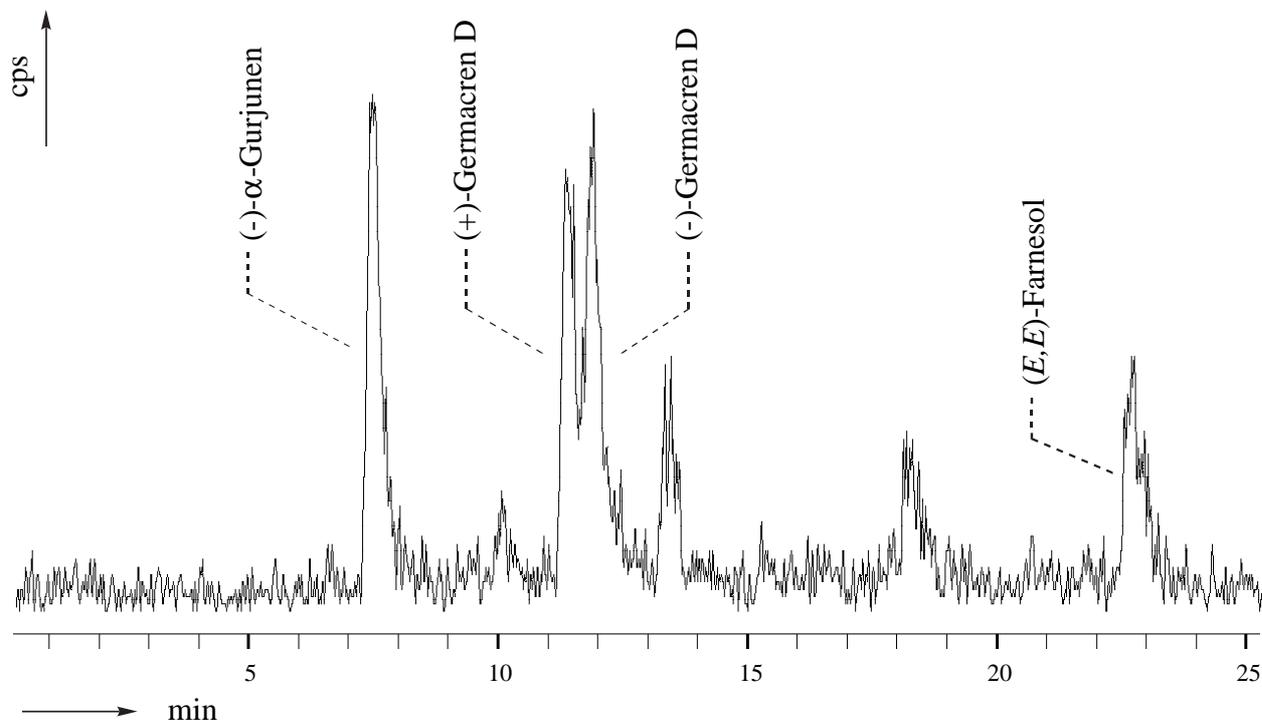
---

\* Da die enzymatisch produzierten Substanzmengen (also die radioaktiv markierten Sesquiterpene) sehr gering sind, werden diese Substanzen nicht im FID detektiert. Ausschließlich die Zugabe größerer Mengen eines Standards liefert Signale im FID.

† Nach der Reduktion der organischen Verbindungen im Platinreaktor durchläuft das gebildete CH<sub>4</sub> noch eine gewisse Strecke bis zum Radiodetektor um abzukühlen. Dabei wird die „Gaswolke“ auseinandergezogen und zusätzlich mit Quenchinggas verdünnt. Dies führt zu leichten Inhomogenitäten der CH<sub>3</sub><sup>3</sup>H-Verteilung innerhalb der „Wolke“, was sich wiederum in Spikes bemerkbar macht.

allerdings die Stabilität von Sesquiterpen-Synthasen; somit mußten die Enzyme zunächst in einen KCl freien Puffer überführt werden. Für diesen Zweck wurden Entsalzungssäulen der Firma *Bio-Rad* benutzt.

Die entsalzte DEAE-Fraktion wurde einem Macroassay unterzogen, dessen Ergebnis in Abb. 40 zu sehen ist.



**Abb. 40** Radio-GC Analyse von Macroassay-Produkten der DEAE-Fraktion (6T-2,3-Me- $\beta$ -CD; 116°C für 14 min mit 15°C/min  $\rightarrow$  170°C).

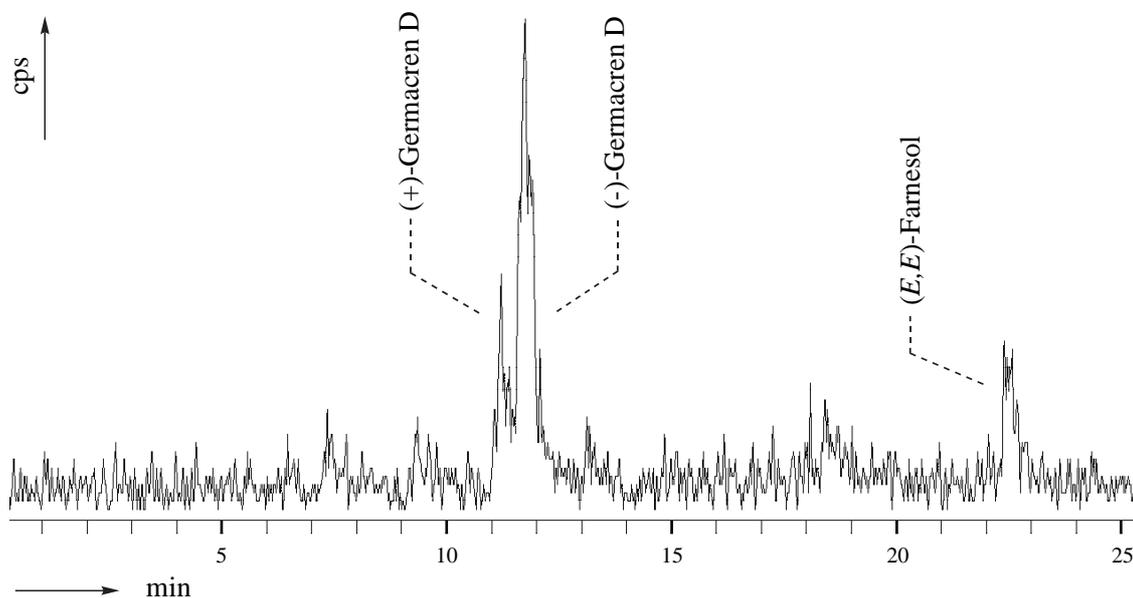
Das Verhältnis von (-)- $\alpha$ -Gurjunen/(-)-Germacren D/(*E,E*)-Farnesol ist nach dem DEAE-Reinigungsschritt identisch mit dem des Rohextraktes, allein die (+)-Germacren-D-Synthase-Aktivität ist geringer als im Enzymrohextrakt. Zunächst erscheint dieses Ergebnis gegen den Reinigungsschritt zu sprechen. Dabei ist allerdings zu bedenken, daß der DEAE-Extrakt wesentlich stabiler ist als der Rohextrakt, da durch die Chromatographie kontaminierende Proteasen entfernt wurden. Er konnte ohne nennenswerten Aktivitätsverlust über Monate bei -80°C gelagert werden. Im Hinblick auf die weiteren Reinigungsschritte ist dies äußerst bedeutsam, da durch diesen Schritt ein „Vorrat“ des Enzymextraktes angelegt werden konnte. Folgende Reinigungsschritte konnten direkt mit der DEAE-Fraktion durchgeführt werden, ohne jedesmal einen neuen Enzymrohextrakt erstellen zu müssen. Hinzu kommt, daß nicht nur störende Proteasen durch diesen Schritt entfernt wurden, sondern auch eine Vielzahl anderer Proteine. Da FDP kein Substrat für diese Proteine ist, macht sich ihre Abwesenheit im Macroassay nicht sichtbar, trotzdem ist diese Tatsache essentiell für weitere Reinigungsschritte, die mit der FPLC-Technik (Fast-

Protein-Liquid-Chromatography) arbeiten. FPLC ermöglicht zwar sehr hohe Trennleistungen, hat aber nur eine geringe Kapazität, sie kann somit nur für teilweise aufgereinigte Extrakte verwendet werden<sup>[70]</sup>.

Auf das Problem des Aktivitätsverlustes von (+)-Germacren D Synthase wird gesondert in Kapitel 4.3.3, Seite 53 eingegangen.

Für eine weitere Aufreinigung der DEAE-Fraktion wurden verschiedene Reinigungstechniken ausprobiert<sup>[101]</sup>. Im folgendem wird nur auf die Schritte eingegangen, die letztlich erfolgreich waren\*.

Mit Hilfe eines Test-Kits (*Sigma*) wurden im kleinen Maßstab verschiedene Dye-Liganden-Chromatographie-Phasen getestet<sup>[102]</sup>. Ziel war es, eine Phase zu finden, die die gesuchten Synthasen zunächst bindet und beim Spülen mit einem KCl-Puffer diese wieder eluiert. Nur zwei Phasen erfüllten die gesetzten Bedingungen: Reactive Red 120 und Red A. Im größeren Maßstab bewährte sich die Reactive Red 120-Phase etwas besser als die Red A-Phase, somit fiel die Wahl auf diese Phase. Die DEAE-Fraktion wurde auf die Säule gegeben und mit 1.5 M KCl eluiert. Das Eluat wurde fraktioniert gesammelt und jede Fraktion per Microassay auf Aktivität untersucht. Es wurde nur ein Aktivitätsspek detektiert, die zugehörigen aktiven Fraktionen wurden in KCl-freiem Puffer entsalzt (*Bio-Rad*-Entsalzungssäule). Ein Macroassay der Red 120-Fraktion zeigte folgendes Ergebnis (Abb. 41):

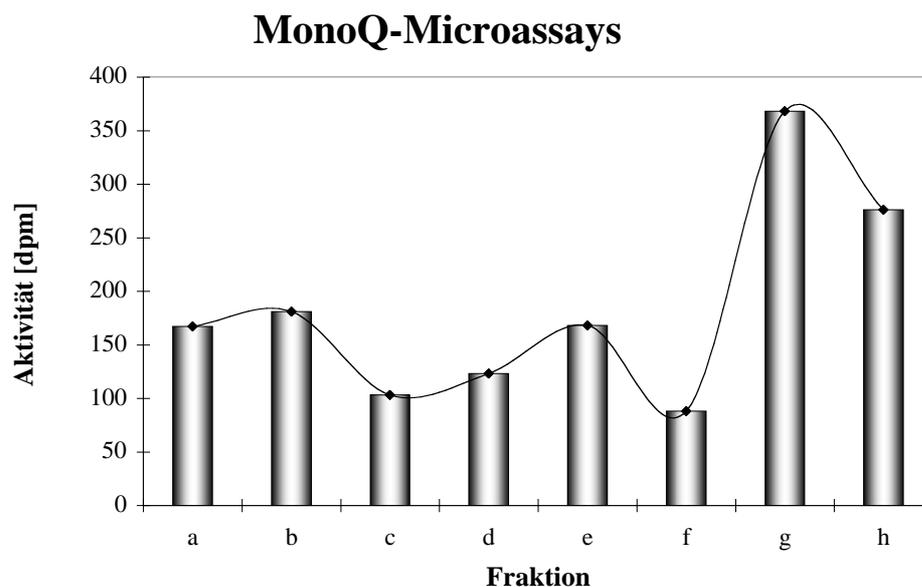


**Abb. 41** Radio-GC Analyse von Macroassay-Produkten der Red 120-Fraktion (6T-2,3-Me- $\beta$ -CD; 116°C für 14 min mit 15°C/min  $\rightarrow$  170°C).

\* Zusätzlich wurde noch die Anwendung von Hydroxylapatit-Chromatographie und Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (mit einer Phenylsepharose-Phase) ausprobiert. Erstere lieferte schlechtere Ergebnisse als der oben beschriebene Reinigungsweg, während die HIC-Technik die gesuchten Enzyme vollständig denaturierte und somit ungeeignet war. Daher wird auf diese Technik auch im Experimentellen Teil nicht weiter eingegangen.

Der Reinigungsschritt liefert eine deutliche Reduzierung der Phosphohydrolasenaktivität (geringere Farnesol-Produktion) und eine fast komplette Abtrennung der (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase. Zudem zeigte sich, daß viele andere Proteine durch diesen Schritt entfernt wurden (siehe Tab. 2, Seite 52). Negativ ist allerdings ein erneuter Verlust an (+)-Germacren-D-Synthase-Aktivität. Im Zusammenhang mit anderen Ergebnissen (siehe Kapitel 4.3.3, Seite 53) deutet dies darauf hin, daß es sich bei (+)-Germacren-D-Synthase um eine extrem labile Synthase handelt, die leicht denaturiert. Somit ist ein Aktivitätsverlust unvermeidlich. Da aber auch in der Red 120 Fraktion noch genügend (+)-Germacren-D-Synthase-Aktivität für weitere Reinigungsschritte vorhanden war, wurde ein gewisser Aktivitätsverlust durch den Red 120-Reinigungsschritt akzeptiert.

Letzter Schritt der Germacren-D-Synthesen-Isolierung war eine FPLC-Chromatographie mit MonoQ-Phase (starker Anionenaustauscher). Die hohe Trennleistung der FPLC ermöglichte es, (+)- von (-)-Germacren-D-Synthase zu isolieren. Zur Durchführung wurde die Red 120-Fraktion auf eine MonoQ-Säule gegeben und gebundene Enzyme mittels eines mehrstufigen KCl-Gradienten eluiert<sup>[62]\*</sup>. Das Eluat wurde fraktioniert gesammelt und auf Aktivität untersucht (Microassays in Abb. 42).

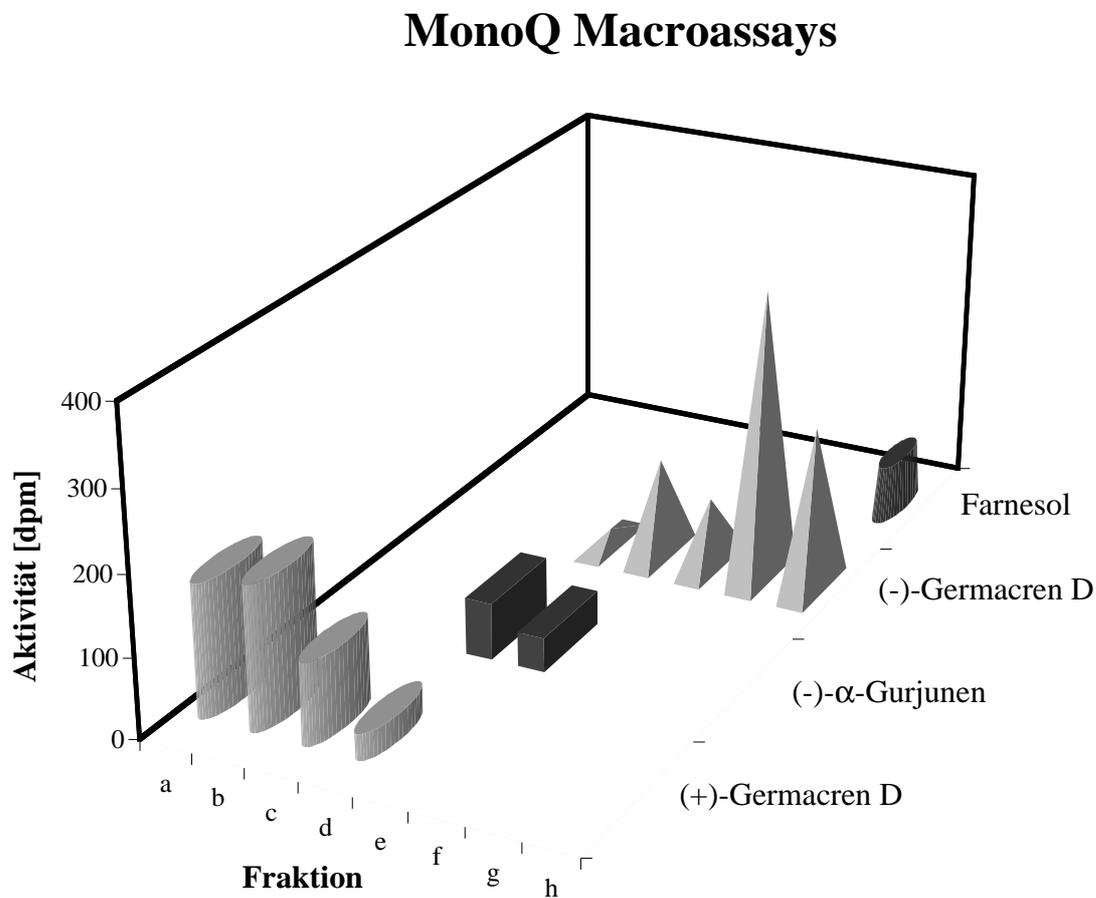


**Abb. 42** Auswertung der MonoQ-Microassays.

Dabei deuteten sich drei Aktivitätspeaks an. Fraktionen, die den drei Peaks zugeordnet waren, wurden jeweils separat in Macroassays untersucht. Ergebnis war, daß es sich bei dem ersten und dem letzten Aktivitätspeak um (+)- bzw. (-)-Germacren-D-Synthase handelte (der mittlere Peak wurde durch Reste von (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase-Aktivität her-

\* Interessanterweise konnte die Sesquiterpen-Synthesen-Aktivität durch Zugabe des Detergenz Tween 20 zu den Chromatographie-Puffern deutlich erhöht werden.

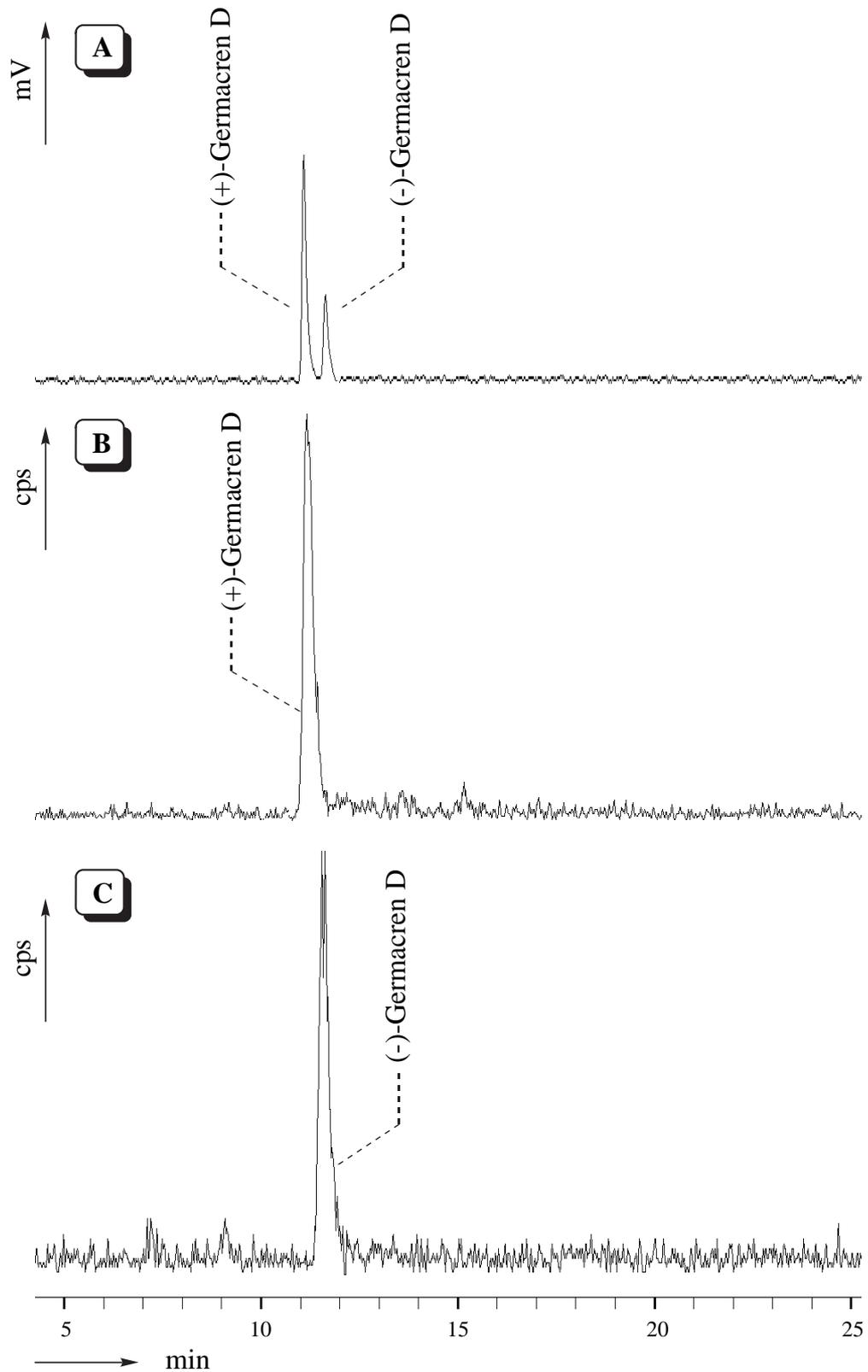
vorgerufen). Abb. 43 veranschaulicht die Verteilung der Synthesen über die aktiven Fraktionen nach MonoQ.



**Abb. 43** Auswertung der Aktivitäten von MonoQ Macroassays.

Die relativ hohe Aktivität in den Fraktionen d und e rührt also nicht allein von Resten der (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase-Aktivität, sondern wird überwiegend durch Tailing der anderen Aktivitäten hervorgerufen.

Abb. 44 vergleicht die Radio-Gaschromatogramme der Assays von Fraktion a-c (gepoolt, von nun an MonoQ Fraktion I genannt) mit den Assays von Fraktion f-g (gepoolt, von nun an MonoQ Fraktion II genannt). Es wurde bewiesen, daß Fraktion I ausschließlich (+)-Germacren-D-Synthase beinhaltet, während Fraktion II (-)-Germacren-D-Synthase in reiner Form enthält. Die Identifizierung der Komponenten erfolgte durch Koinjektionen mit unmarkierten Germacren D-Standards.



**Abb. 44** Radio-GC-Analyse von Macroassay-Produkten der MonoQ Fraktionen I und II (6T-2,3-Me- $\beta$ -CD; 116°C für 14 min mit 15°C/min  $\rightarrow$  170°C). A: FID Signal der Germacren D-Standards. B: Radiosignal des Assay-Produktes von Fraktion I. C: Radiosignal des Assay-Produktes von Fraktion II.

Damit war erstmals bewiesen, daß *S. canadensis* zwei enantioselektive Synthesen enthält, die für die Biosynthese von (+)- und (-)-Germacren D verantwortlich sind:

- (+)-Germacren D Synthase, die enantioselektiv (+)-Germacren D synthetisiert und
- (-)-Germacren D Synthase, die enantiomerenreines (-)-Germacren D synthetisiert.

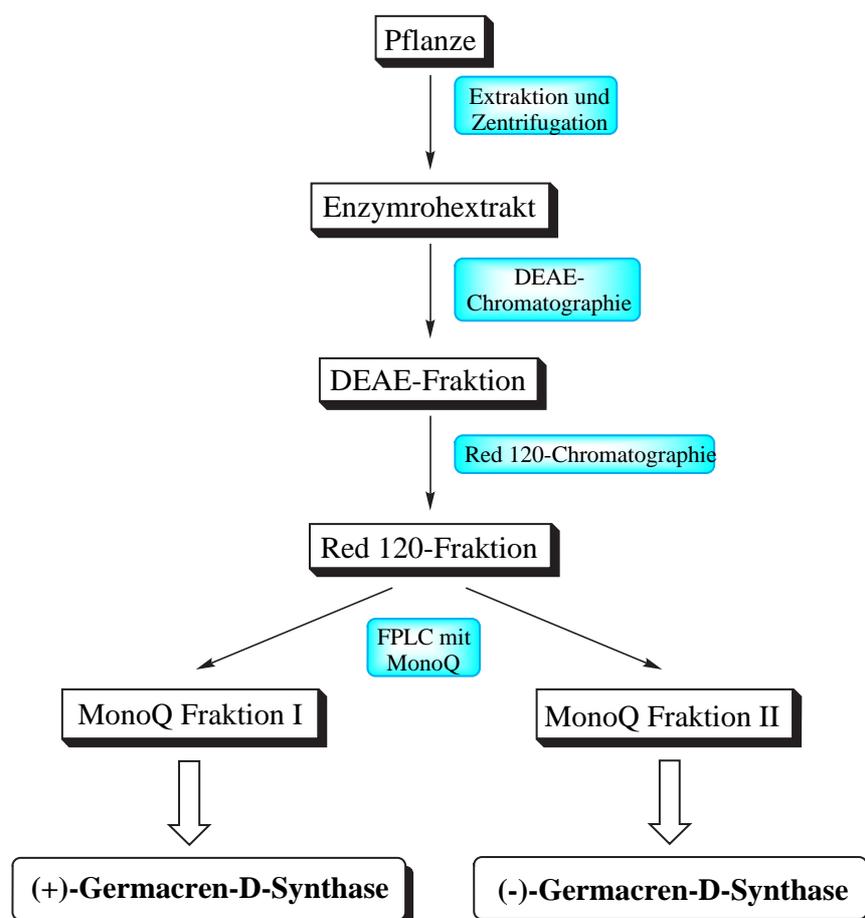
Es wurde somit zum ersten Mal gezeigt, daß eine Pflanze zwei verschiedene Enzyme besitzt, die die Biosynthese von Sesquiterpen-Enantiomeren katalysieren<sup>[99]</sup>. Ein ähnliches Phänomen wurde 1982 für Monoterpen-Synthesen postuliert<sup>[103]</sup>. Es wurde vermutet, daß in der Pflanze *Salvia officinalis* (Salbei) eine (+)- und eine (-)- $\alpha$ -Pinen-Synthase vorhanden ist, da beide Substanzen zu den Hauptkomponenten des ätherischen Öls von Salbei zählen. Genauere Analysen zeigten allerdings 1984, daß in der Tat zwei verschiedene Synthesen vorhanden sind, beide Synthesen sind aber „Multi-Produkt-Synthesen“, die neben (+)- und (-)- $\alpha$ -Pinen auch eine Reihe anderer Monoterpene synthetisieren<sup>[104]</sup>. Konsequenterweise wurden die beiden Synthesen dann auch Pinen-Synthase I und II genannt, da beide keine enantiomerenreinen Verbindungen synthetisieren. Mittlerweile wurde auch ein Cyclisierungsmechanismus für Pinen-Synthase I und II entworfen, der durch Inhibitorstudien gestützt wird<sup>[105]</sup>.

Um einen Eindruck über die Güte der durchgeführten Reinigungsschritte zu erhalten, wurde eine Reinigungstabelle erstellt. Zu diesem Zweck wurde mittels Microassays von jedem Enzymextrakt die Sesquiterpen-Synthesen-Gesamtaktivität bestimmt. Außerdem wurde für jeden Extrakt der Proteingehalt gemessen. Für den Enzymrohextrakt, die DEAE-Fraktion und die Red 120-Fraktion wurde der Proteingehalt mit Hilfe des Coomassie Plus Protein-Assays (*Pierce*) bestimmt. Da die MonoQ-Fraktionen zusätzlich noch Tween 20 enthielten, wurden sie zunächst in einen 50 mM  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -Puffer entsalzt und ihr Proteingehalt anschließend mittels Micro-BCA-Protein-Assay (*Pierce*) bestimmt. Bei Kenntnis von Proteingehalt und Gesamtaktivität kann ein sog. Reinigungsfaktor<sup>[66]</sup> errechnet werden (Tab. 2). Beide Synthesen wurden um den Faktor 123 aufgereinigt.

Reinigungsschritt	Gesamt-Protein [mg]	Gesamt-aktivität [nmol h <sup>-1</sup> ]	Spezifische Aktivität [nmol h <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Enzymrohextrakt	63.2	834.1	13.20	100	1.0
DEAE-Eluat	7.1	714.9	100.7	86	7.63
Dye Red 120	1.5	226.9	151.3	27	11.5
MonoQ					
(+)-Germacren-D-Synthase	0.04	64.7	1618	7.8	<b>123</b>
(-)-Germacren-D-Synthase	0.06	97.3	1622	12	<b>123</b>

**Tab. 2** Reinigungstabelle für (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase.

Abb. 45 zeigt nochmals in Form eines Flußschemas die Reinigungsschritte, die zur Isolierung von (+)- und (-)-Germacren D Synthase führten.



**Abb. 45** Flußschema der (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase Isolierung.

Nachdem nun bewiesen war, daß zwei verschiedene Synthesen für die Biosynthese von (+)- und (-)-Germacren D in *S. canadensis* verantwortlich sind, blieb die Frage, warum während der Enzymreinigung relativ viel Aktivität der (+)-Germacren D-Synthase verloren geht. Daher wurde nach einem alternativen Reinigungsweg für (+)-Germacren-D-Synthase gesucht (siehe Kapitel 4.3.3).

### 4.3.3 Ein alternativer Weg zur Isolierung von (+)-Germacren-D-Synthase

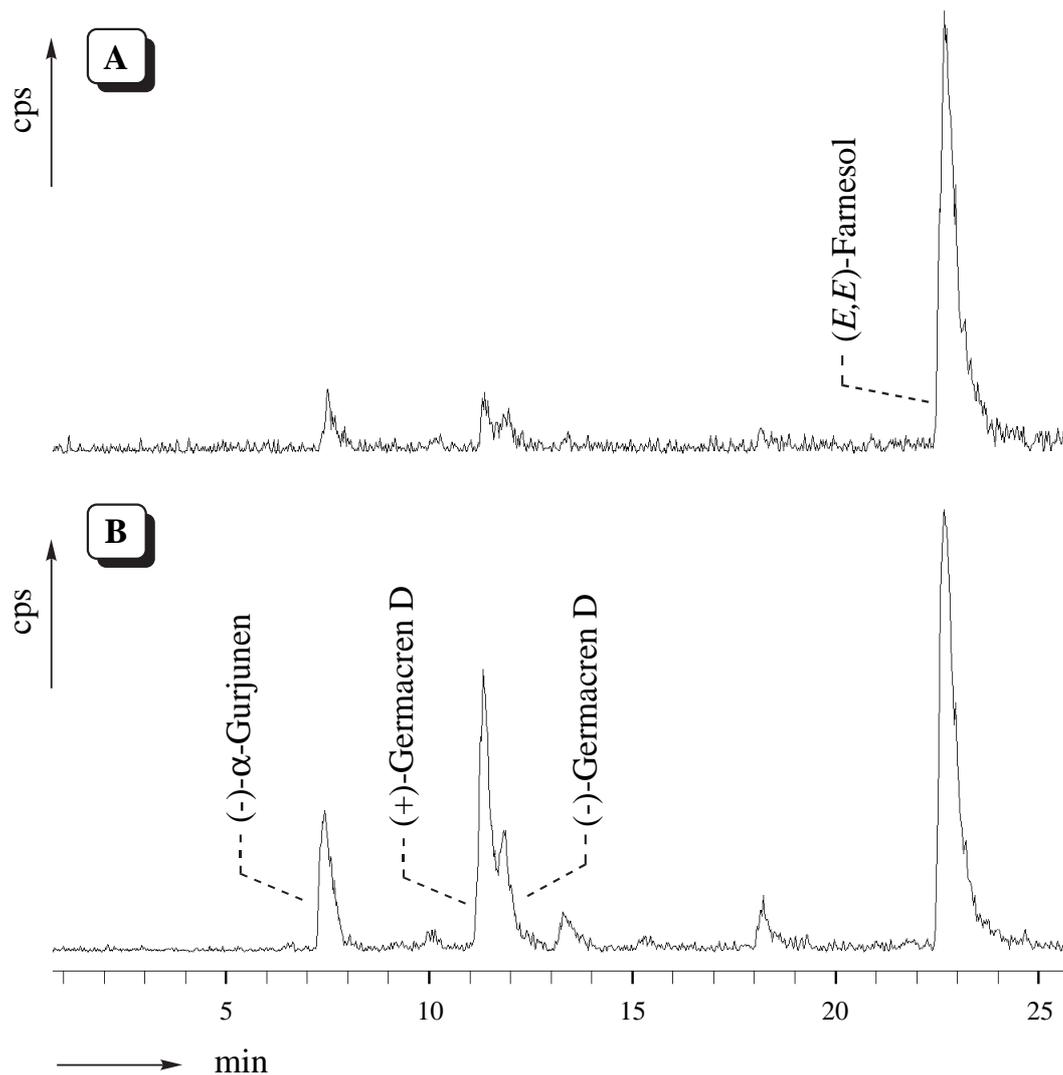
Eine genauere Betrachtung des zuvor vorgestellten Reinigungsweges zeigt, daß ein Großteil der (+)-Germacren-D-Synthase-Aktivität bereits nach dem DEAE-Reinigungsschritt verloren geht. Davon ausgehend wurde die Annahme gemacht, daß die Synthase nur eine geringe Affinität zu dem Anionenaustauscher hat und somit nur schwach gebunden wird. Dieser Theorie zufolge müßte schon beim Auftragen des Rohextraktes auf die DEAE Säule ein Großteil der (+)-Germacren-D-Synthase durchlaufen\*. Da der sog. Durchlauf ein Volumen von ca. 100 ml besitzt, wird er routinemäßig nicht in Microassays getestet, da etwaige Synthase-Aktivität zu verdünnt ist, um detektiert werden zu können. In einem alternativen „Batch“-Verfahren der DEAE-Chromatographie wurde deshalb der Enzym-Rohextrakt direkt mit DEAE-Cellulose vermischt (ohne Verwendung einer Säule!). Ziel war es, möglichst viele Proteine außer der (+)-Germacren-D-Synthase an die Cellulose zu binden, um anschließend den Überstand zur Isolierung der Synthase zu verwenden.

Da der Überstand immer noch ein Volumen von 45 ml besaß, mußte zunächst ein Schritt zur Aufkonzentrierung des Überstandes durchgeführt werden. Dazu wurde der Überstand mit Ammoniumsulfat (AMS) versetzt, bis eine 80%ige Sättigung der Lösung entstand<sup>[106]</sup>. Auf diesem Wege wurden sämtliche Proteine, die sich im Überstand befanden, ausgefällt. Die Suspension wurde zentrifugiert und das Protein-Pellet anschließend in 6 ml Puffer resuspendiert und entsalzt um AMS-Reste zu entfernen. Der erhaltene Extrakt (im folgendem AMS-Präzipitat genannt) konnte dann per Macroassay analysiert werden. Wie Abb. 46A zeigt, war kaum Synthase-Aktivität zu beobachten, stattdessen wurde nur eine hohe Phosphohydrolasen Aktivität gemessen.

Das Hauptproblem lag somit in der hohen Phosphohydrolasen-Aktivität. Um diese zu reduzieren, wurden den Assays Phosphohydrolaseninhibitoren zugesetzt<sup>[69]</sup>. Als besonders geeignet erwies sich eine Konzentration von 6 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . Abb. 46B zeigt die Macroassay-Produkte des AMS-Präzipitats unter Zugabe von 6 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . Es wird deutlich, daß tatsächlich ein Teil der (+)-Germacren-D-Synthase nicht an DEAE gebunden wird. Fernerhin wird auch wieder etwas (-)-Germacren-D- und (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase-Aktivität detektiert. Somit wäre der Verbleib der (+)-Germacren-D-Synthase nach dem DEAE-Reinigungsschritt geklärt. Es stellte sich nun die Frage, ob eine weitere Aufreinigung des AMS-Präzipitats zu einem höheren Reinigungsfaktor führen würde, als auf dem in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Weg.

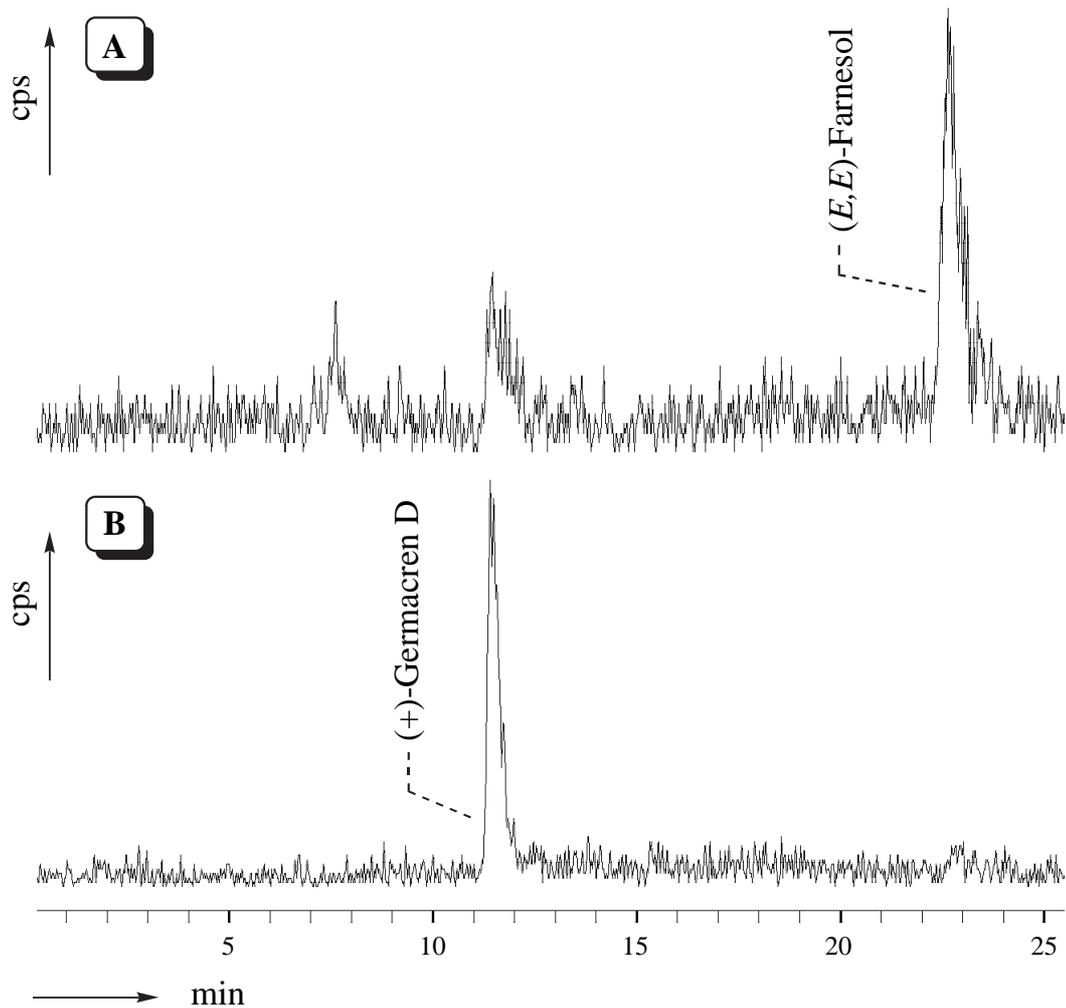
---

\* Da es Ziel ist, möglichst viele Verunreinigungen aus dem Enzymextrakt zu entfernen, wird nach Auftragung des Rohextraktes die DEAE-Säule nochmals mit rund 100 ml Puffer gespült bevor die Elution per KCl-Gradient beginnt. Diese Verfahren dient zum Entfernen nicht gebundener Proteine. Gewöhnlich wird davon ausgegangen, daß Synthasen an die DEAE-Phase binden.



**Abb. 46** Radio-GC-Analyse von Macroassay-Produkten der AMS-Präzipitate (6T-2,3-Me- $\beta$ -CD; 116°C für 14 min mit 15°C/min  $\rightarrow$  170°C). A: Radiosignal des Assay-Produktes ohne Inhibitor. B: Radiosignal des Assay-Produktes mit 6 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  als Phosphohydrolasen-Inhibitor.

Zur Klärung dieser Frage wurde das AMS-Präzipitat zunächst über Red 120-Chromatographie und abschließend über FPLC-Chromatographie mit MonoQ gereinigt. Abb. 47 zeigt, daß auch auf diesem Wege reine (+)-Germacren-D-Synthese isoliert werden kann.

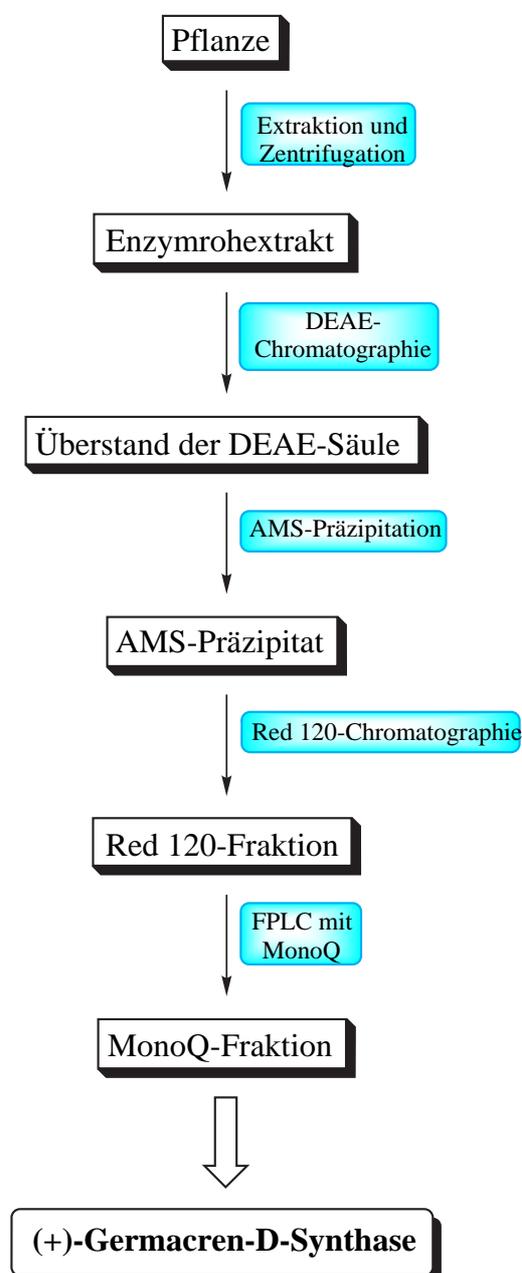


**Abb. 47** Radio-GC-Analyse von Macroassay-Produkte der (+)-Germacren-D-Synthase Reinigungsschritte (6T-2,3-Me- $\beta$ -CD; 116°C für 14 min mit 15°C/min  $\rightarrow$  170°C). A: Radiosignal des Assay-Produktes nach Red 120-Chromatographie mit 8 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  als Phosphohydrolasen-Inhibitor. B: Radiosignal des Assay-Produktes nach MonoQ-Chromatographie (ohne Inhibitor).

Die Anfertigung einer Reinigungstabelle zeigte allerdings, daß die auf diesem Wege gewonnene (+)-Germacren-D-Synthase nur einen Reinigungsfaktor von 22 besitzt (Tab. 3).

Reinigungsschritt	Gesamt-Protein [mg]	Gesamt-aktivität [nmol h <sup>-1</sup> ]	Spezifische Aktivität [nmol h <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ]	Ausbeute [%]	Reinigungsfaktor
Enzymrohextrakt	63.2	834.1	13.20	100	1.0
AMS-Fällung des DEAE-Überstandes	12.1	112.0	9.26	13.4	0.70
Dye Red 120	0.60	112.0	186.7	13.4	14.14
MonoQ	0.12	35.1	292.5	4.2	<b>22.16</b>

**Tab. 3** Reinigungstabelle für die alternative (+)-Germacren-D-Synthase Isolierung.



**Abb. 48** Flußschema der alternativen (+)-Germacren-D-Synthase Isolierung.

Der niedrige Reinigungsfaktor ist durchaus verständlich in Anbetracht der Tatsache, daß der Überstand bzw. Durchlauf des DEAE-Reinigungsschrittes verwendet wurde. Da viele Proteine nicht an DEAE gebunden werden, wurde nun mit dem AMS-Präzipitat ein Extrakt erstellt, der neben der gesuchten Synthase auch zahlreiche andere Proteine enthielt. Dazu zählen auch die unspezifischen Phosphohydrolasen, deren störender Einfluß auf die Assays nur durch Verwendung von Inhibitoren gemindert werden konnte. Der Extrakt ist mit Proteinen kontaminiert, die weder durch Dye-Liganden-Chromatographie, noch durch FPLC-Chromatographie an einer MonoQ-Phase vollständig entfernt werden können. Bei dem in Kapitel 4.3.2 beschriebenen Weg wurden diese störenden Proteine bereits durch den DEAE-Schritt entfernt. Der alternative Weg dient somit nur dem Nachweis, daß (+)-Germacren-D-Synthase nicht irreversibel verloren geht.

Ein weiteres wichtiges Resultat ist in diesem Zusammenhang, daß die (+)-Germacren-D-Synthasen, die auf zwei verschiedenen Wegen isoliert wurden auch identisch miteinander sind.

Bewiesen wurde dies durch die Tatsache, daß bei beiden Wegen MonoQ der letzte Reinigungsschritt war und die Synthesen exakt bei derselben KCl-Konzentration eluiert wurden. Dies bedeutet, daß ihre isoelektrischen Punkte identisch sind (siehe Trennprinzip von MonoQ, Kapitel 3.3, Seite 31); dies ist nur der Fall bei identischen Proteinen.

Verständlicherweise wurden für die in Kapitel 4.4 beschriebenen Charakterisierungsexperimente der Synthesen die effektiver aufgereinigte (+)-Germacren-D-Synthase aus dem ersten Isolierungsweg verwendet.

Abb. 48 zeigt zusammenfassend ein Flußschema der alternativen (+)-Germacren-D-Synthase-Aufreinigung.

#### 4.3.4 Isolierung von (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase

Die Isolierung der (+)- und (-)-Germacren-D-Synthesen hatte bereits gezeigt, daß sich im Enzymrohextrakt und auch im KCl-Eluat des DEAE-Reinigungsschrittes eine hohe (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase-Aktivität nachweisen läßt. Somit wurde als Startmaterial für eine Isolierung der  $\alpha$ -Gurjunen-Synthase<sup>[107]</sup> erneut die DEAE-Fraktion gewählt\*.

Neben (-)- $\alpha$ -Gurjunen wird sowohl vom Rohextrakt als auch von der DEAE-Fraktion (+)- $\gamma$ -Gurjunen<sup>[108]</sup> produziert (Abb. 49). Das Mengenverhältnis der Substanzen liegt jeweils bei 91% (-)- $\alpha$ -Gurjunen und 9% (+)- $\gamma$ -Gurjunen.

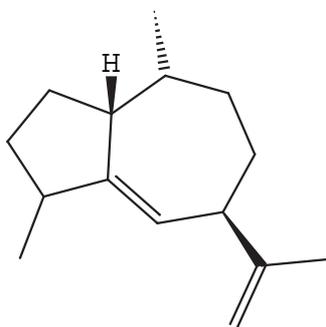
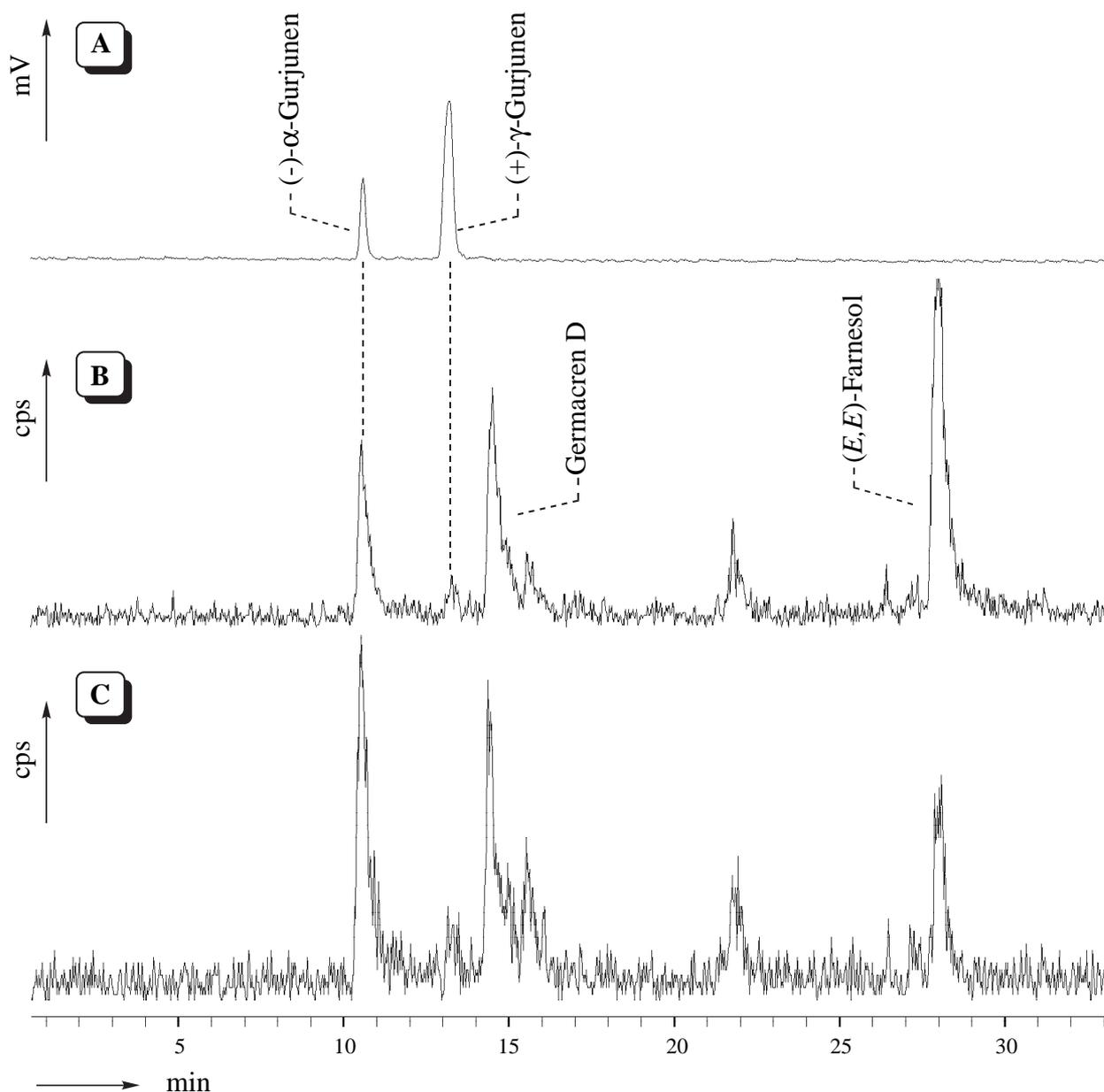


Abb. 49 Struktur von (+)- $\gamma$ -Gurjunen.

Die Konfiguration beider Verbindungen wurde jeweils durch Koinjektionen mit racemischen Standards an einer chiralen 6T-2,3-Me- $\beta$ -CD-Phase ermittelt. Nachdem die Stereochemie aufgeklärt war, wurde für weitere Radio-GC-Analysen eine achirale fused-silica Kapillarsäule benutzt.

Abb. 50 zeigt die Analyse der Assay Produkte (Radio-GC) eines neu erstellten Enzymrohextraktes und einer neuen DEAE-Fraktion.

\* Im Folgendem wird erneut auf eine Reihe von Techniken eingegangen, die bereits in Kapitel 4.3.2 (Seite 44) detailliert beschrieben wurden (DEAE-, Dye-Liganden-, MonoQ-Chromatographie, Proteinkonzentrationsbestimmungen, Micro- und Macroassays, Reinigungstabellen etc.), eine genauere Beschreibung dieser Techniken entfällt somit in diesem Kapitel.

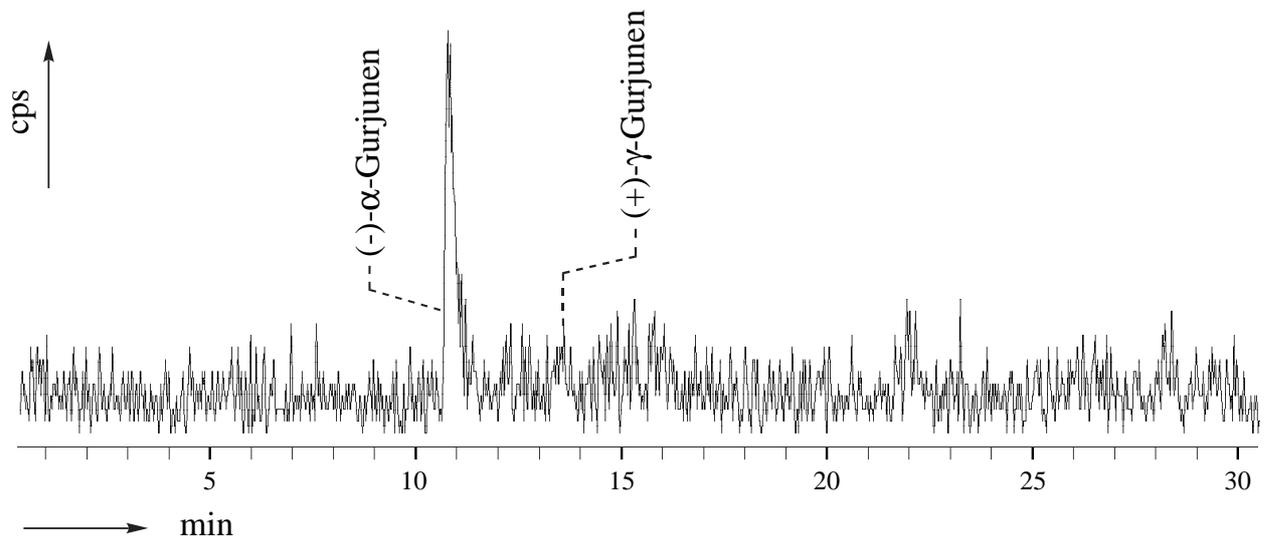


**Abb. 50** Radio-GC Analyse der Macroassay-Produkte des Enzymrohextraktes und der DEAE-Fraktion (EconoCap EC-WAX-Kapillarsäule; 70°C für 1 min mit 5°C/min  $\rightarrow$  210°C). A: FID-Signal der Gurjunen-Standards. B: Radiosignal der Assay-Produkte vom Enzymrohextrakt. C: Radiosignal der Assay-Produkte der DEAE-Fraktion.

Zunächst schien die Produktion von (+)- $\gamma$ -Gurjunen auf das Vorhandensein einer (+)- $\gamma$ -Gurjunen-Synthase hinzudeuten. Wie sich im weiteren Verlauf der (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthesen-Isolierung allerdings herausstellte, wurde die Bildung von  $\alpha$ -Gurjunen stets auch von der Produktion von  $\gamma$ -Gurjunen begleitet. Dies legte die Vermutung nahe, daß es sich bei der (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthese um eine Multi-Produkt-Synthase handelt, deren Nebenprodukt (+)- $\gamma$ -Gurjunen ist (zur Theorie einer Multi-Produkt-Synthase siehe Kapitel 3.2.3, Seite 26). Zum Beweis dieser Hypothese wurden zahlreiche unterschiedliche Reinigungsmethoden zur Isolierung der (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase eingesetzt. Ziel war es, zu

demonstrieren, daß das Verhältnis der  $\alpha/\gamma$ -Gurjunen-Produktion nach jedem Reinigungsschritt konstant bleibt. Dies wäre ein eindeutiger Beweis, daß es sich tatsächlich um nur eine einzige Synthese handelt. Im restlichen Teil dieses Kapitels wird auf die unterschiedlichen Reinigungstechniken eingegangen, die angewandt wurden. Ein weiterer Beweis, daß es sich um eine Multi-Produkt-Synthese handelt, wird in Kapitel 4.4.1.1 (Seite 66) mit Hilfe der Gelelektrophorese erbracht.

Da aus der Germacren-D-Synthesen-Isolierung bereits bekannt war, daß durch einen Red 120-Chromatographie-Schritt die Germacren-Synthesen von der  $\alpha$ -Gurjunen-Synthese abgetrennt werden können, war die logische Schlußfolgerung, den Verbleib der Gurjunen-Synthese nach dem Red 120-Schritt zu untersuchen. Die Elution der Red 120-Phase mit Puffern unterschiedlicher KCl-Konzentration lieferte jeweils keine  $\alpha$ -Gurjunen-Synthese-Aktivität. Im Durchlauf der Säule wurde allerdings Gurjunen-Synthese-Aktivität detektiert (Abb. 51).

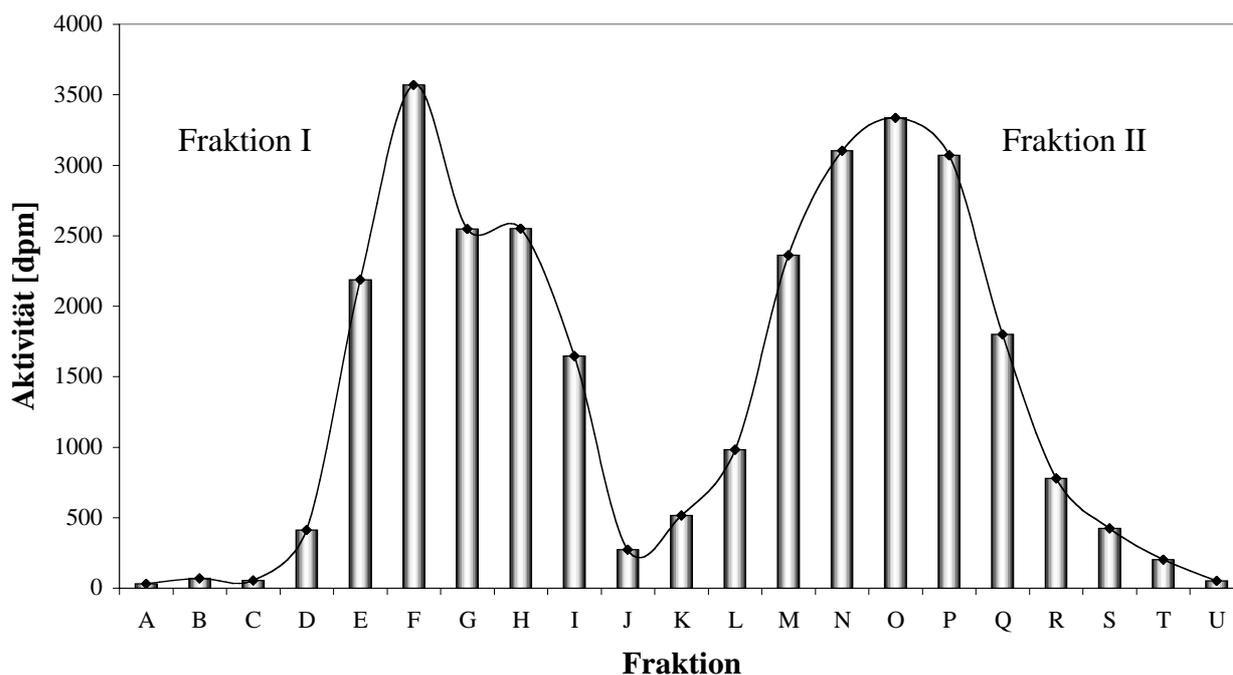


**Abb. 51** Radio-GC-Analyse der Macroassay-Produkte des Red 120-Durchlaufes (EconoCap EC-WAX-Kapillarsäule; 70°C für 1 min mit 5°C/min → 210°C). Aufgrund der geringen Aktivität konnte die Menge des synthetisierten (+)- $\gamma$ -Gurjunen nur durch elektronische Subtraktion des Hintergrundrauschens ermittelt werden (hier nicht abgebildet).

Wie schon die Radio-GC Analyse des Red 120-Durchlaufes zeigt, wurde nur eine sehr geringe Gurjunen-Aktivität gemessen. Allerdings konnte auch nach diesem Reinigungsschritt ein konstantes Verhältnis von 91% (-)- $\alpha$ -Gurjunen und 9% (+)- $\gamma$ -Gurjunen detektiert werden. Somit war dieser Reinigungsschritt ein weiterer Beweis für Multi-Produkt-Synthese-Eigenschaften der  $\alpha$ -Gurjunen-Synthese. Da sich der Reinigungsschritt allerdings stark negativ auf die Synthese-Aktivität ausübt, war er für eine effektive Reinigung des Enzyms ungeeignet. Das Austesten verschiedener anderer Dye-Liganden-Phasen brachte ebenfalls nur negative Ergebnisse.

Im Gegensatz zur Dye-Liganden-Chromatographie erwies sich die Hydroxylapatit-Chromatographie als wesentlich geeigneter. Nächster Reinigungsschritt war somit die Auftragung der DEAE-Fraktion auf eine Hydroxylapatit Säule. Dieser Chromatographie-Schritt wurde per FPLC durchgeführt. Synthese-Aktivität wurde mittels eines Phosphat-Gradienten eluiert. In Microassays zeigten sich zwei verschiedene aktive Fraktionen (Abb. 52).

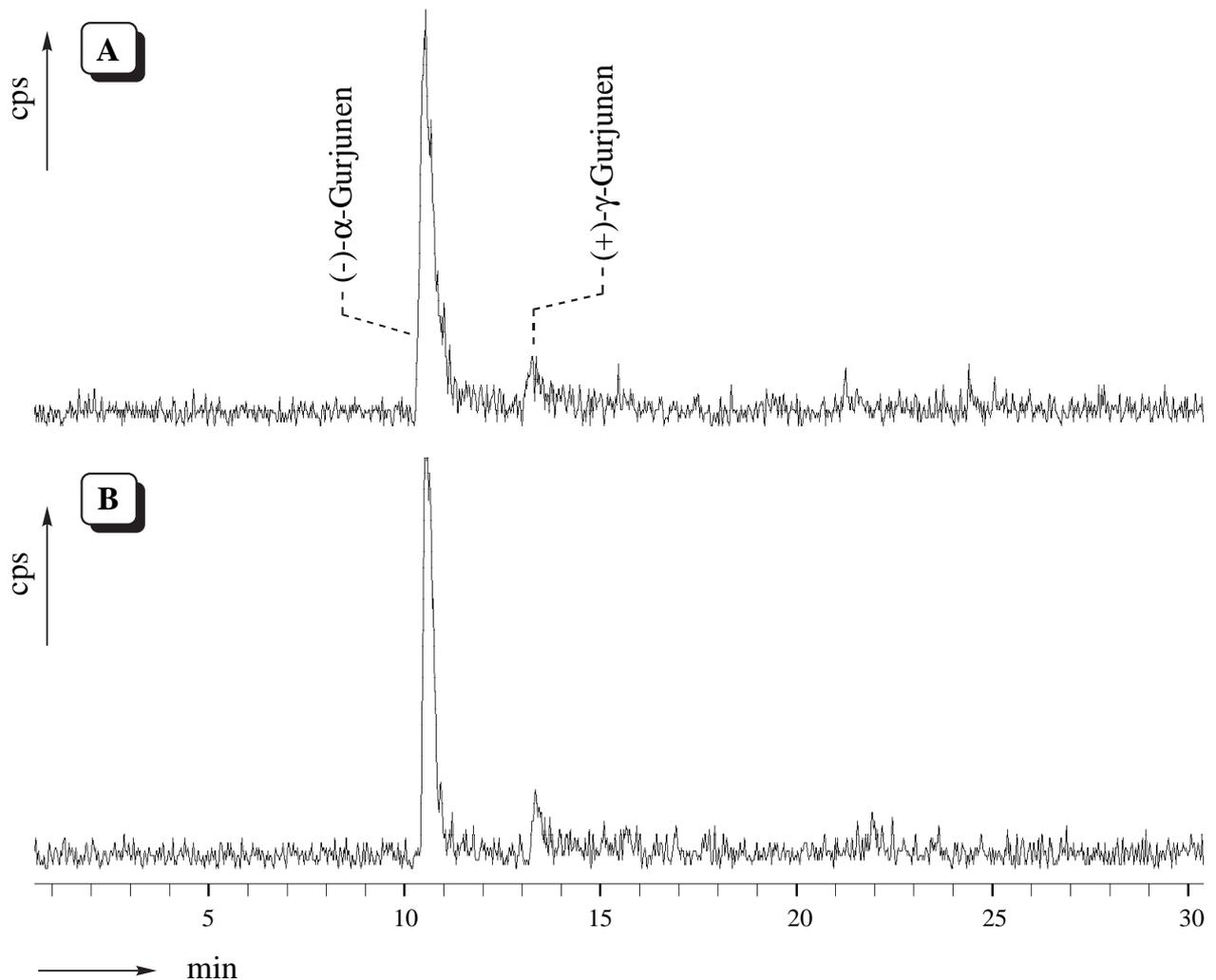
### Microassays nach Hydroxylapatite Chromatographie



**Abb. 52** Auswertung der Hydroxylapatit-Microassays.

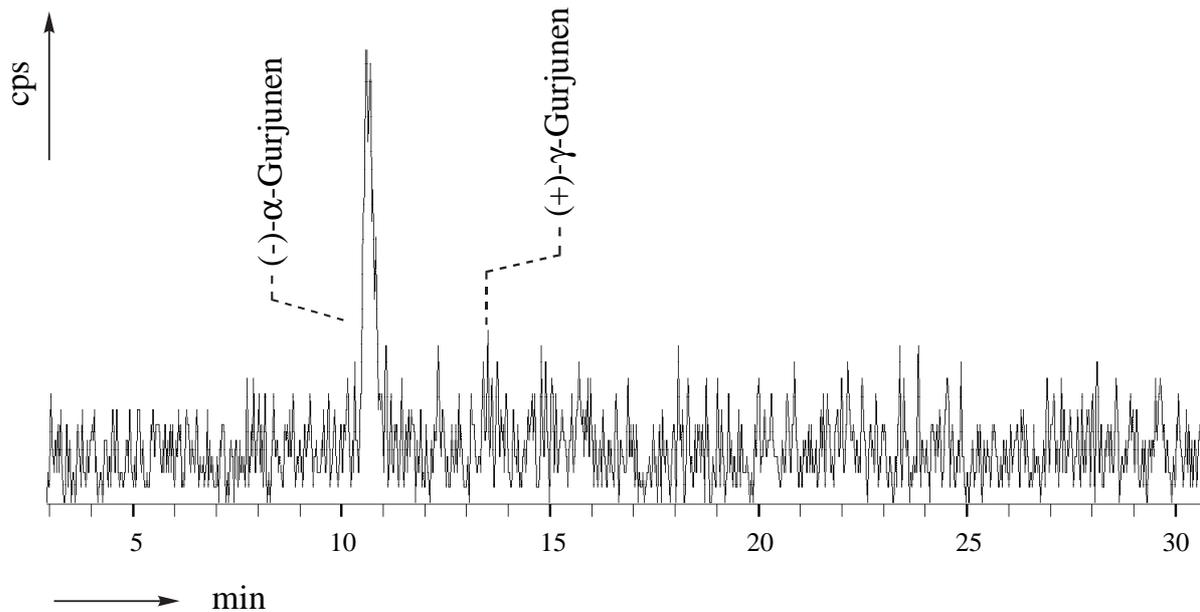
Während es sich bei Fraktion II um eine Mischung von (+)- und (-)-Germacren-D-Synthese handelt (Identifizierung mittels Macroassay), wurde in Fraktion I per Macroassay (+)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthese-Aktivität nachgewiesen (Abb. 53A). Es zeigte sich – wie bei allen vorhergegangenen Reinigungsschritten auch – daß (-)- $\alpha$ -Gurjunen und (+)- $\gamma$ -Gurjunen von der Hydroxylapatit-Fraktion in einem Verhältnis 91:9 produziert wurden. Daher wurde auch diese Fraktion einer weiteren Reinigung unterzogen. Die Fraktion wurde auf eine MonoQ-Säule geladen (FPLC-System, Tween 20 in den Chromatographie-Puffern zur Aktivitätssteigerung) und Synthese-Aktivität per mehrstufigen KCl-Gradienten eluiert. Microassays zeigten nur einen Aktivitätspeak. Die entsprechenden Fraktionen wurden gepoolt und ihre Assay-Produkte per Radio-GC analysiert (Abb. 53B).

Die Analyse der Assay-Produkte zeigt nach beiden Reinigungsschritten dieselbe Produktverteilung: 91% (-)- $\alpha$ -Gurjunen und 9% (+)- $\gamma$ -Gurjunen. Es wurden keine weiteren Produkte detektiert.



**Abb. 53** Radio-GC-Analyse der Macroassay-Produkte der (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase (EconoCap EC-WAX-Kapillarsäule; 70°C für 1 min mit 5°C/min  $\rightarrow$  210°C). A: Radiosignal der Assay-Produkte der Hydroxylapatit-Fraktion. B: Radiosignal der Assay-Produkte der MonoQ-Fraktion.

Um endgültig den Nachweis führen zu können, daß es sich bei der  $\alpha$ -Gurjunen-Synthase um eine Multi-Produkt-Synthase handelt, wurde ein letzter Reinigungsschritt durchgeführt. Die MonoQ-Fraktion wurde zunächst mittels Ultrafiltration auf ein Volumen von ca. 300  $\mu$ L eingengt und in dieser konzentrierten Form per Gelfiltration an einem FPLC-System aufgereinigt. Erwartungsgemäß wurde nach der Gelfiltration per Microassay nur eine aktive Fraktion detektiert, die Aktivität wurde im Macroassay als  $\alpha$ -Gurjunen-Synthase-Aktivität identifiziert (Abb. 54).



**Abb. 54** Radio-GC-Analyse der Macroassay-Produkte der Gelfiltrations-Fraktion (EconoCap EC-WAX-Kapillarsäule; 70°C für 1 min mit 5°C/min → 210°C). Aufgrund der geringen Aktivität konnte die Menge des synthetisierten (+)-γ-Gurjunen nur durch elektronische Subtraktion des Hintergrundrauschens ermittelt werden (siehe auch Abb. 51, Seite 59).

Wie schon bei dem Red 120-Schritt, war die Aktivität nach der Gelfiltration äußerst gering, die Gelfiltration konnte damit nicht als effektiver Reinigungsschritt gelten. Allerdings zeigte die Produktverteilung im Assay-Extrakt erneut die Bildung von 9% (+)-γ-Gurjunen neben dem Hauptprodukt (+)-α-Gurjunen. Der Schritt ist somit ein weiterer Beweis für das Vorhandensein einer Multi-Produkt-Synthese.

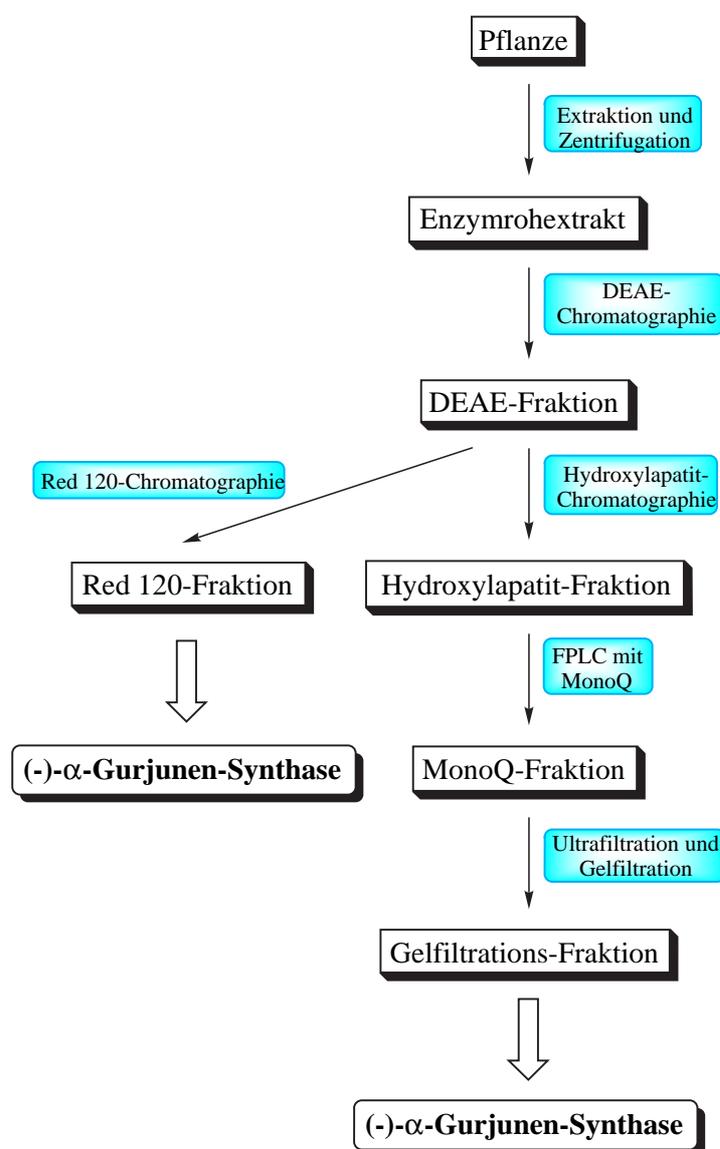
Die Erstellung einer Reinigungstabelle (siehe auch Tab. 2, Seite 52) für die ausgeführten Reinigungsschritte ergab einen Reinigungsfaktor von 741 (Tab. 4).

Reinigungsschritt	Gesamt-Protein [mg]	Gesamt-aktivität [nmol h <sup>-1</sup> ]	Spezifische Aktivität [nmol h <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ]	Ausbeute [%]	Reinigungs-faktor
Enzymrohextrakt	53.4	216.0	4.04	100	1.0
DEAE-Fraktion	8.3	184.3	22.2	85	5.49
Hydroxylapatit	0.73	168.1	230.3	78	57
MonoQ	0.05	149.7	2994	69	<b>741</b>
Gelfiltration	zu niedrig	45.90	-	21.3	-

**Tab. 4** Reinigungstabelle für die (-)-α-Gurjunen-Synthese-Isolierung.

Tab. 4 zeigt, daß nach der Gelfiltration eine Proteinkonzentration erreicht wurde, die weder per Coomassie-Plus- noch per Micro-BCA-Protein-Assay ermittelt werden konnte. Somit mußte die Berechnung eines Reinigungsfaktors nach diesem Schritt entfallen. Es ist allerdings davon auszugehen, daß durch die Gelfiltration keine weitere Erhöhung des Reinigungsfaktors gelungen ist, da parallel zum Absinken der Proteinkonzentration auch die Enzymaktivität stark abnahm\*. Dieser Schritt dient somit nur dem Beweis, daß  $\alpha$ -Gurjunen-Synthase eine Multi-Produkt-Synthase ist. Analoges gilt für den Red 120-Reinigungsschritt, der nicht mit in die Reinigungstabelle aufgenommen wurde.

Abb. 55 veranschaulicht in einem Flußschema die durchgeführten Reinigungsschritte zur Isolierung der  $\alpha$ -Gurjunen-Synthase.



**Abb. 55** Flußschema der  $\alpha$ -Gurjunen-Synthase-Isolierung.

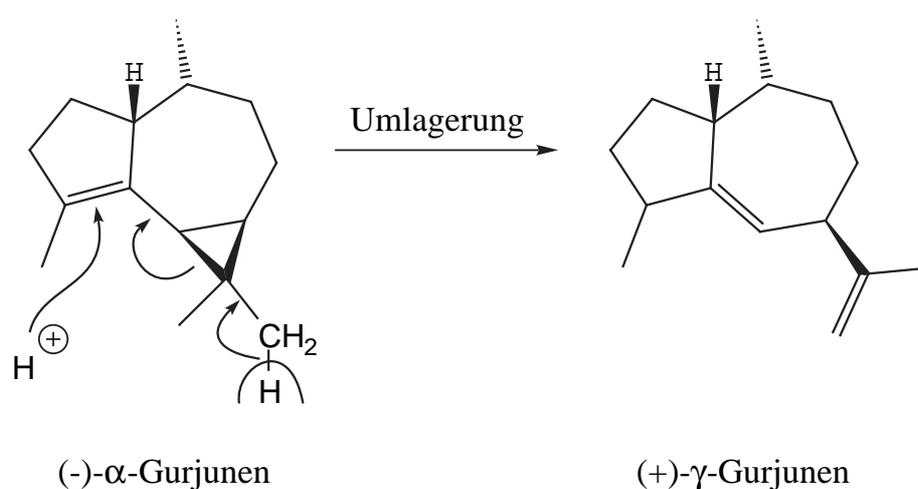
In Anbetracht der Vielzahl von Isolierungsschritten kann folgende Schlußfolgerung getroffen werden: bei der (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase handelt es sich um eine Multi-Produkt-Synthase, deren Nebenprodukt (+)- $\gamma$ -Gurjunen ist. Das Vorhandensein einer spezifischen (+)- $\gamma$ -Gurjunen-Synthase ist auszuschließen, da diese dann exakt dieselben Eigenschaften wie die (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase besitzen müßte. Beide Synthasen müßten identische isoelektrische Punkte besitzen {zweifache Verwendung von Anionenaustauschern (DEAE und MonoQ) zeigt keine Trennung}, sie müßten identische molare Massen haben (Gelfiltration) und identische Wechselwirkungen mit Dye-Liganden-Phasen und der Hy-

\* Es ist zu bedenken, daß für die Durchführung der Gelfiltration als Startmaterial nur die DEAE-Fraktion in Frage kam. Diese wurde dann innerhalb eines Tages per Hydroxylapatit- und MonoQ-Chromatographie aufgereinigt und anschließend per Ultrazentrifugation eingengt bevor die eigentliche Gelfiltration begann. Somit befand sich die gesuchte Synthase rund 8h bei einer Temperatur von 4°C. Dies ist die Ursache für den unvermeidlichen Aktivitätsverlust.

droxylapatit-Phase eingehen. Diese Annahmen sind so unwahrscheinlich, daß es sich um eine einzige Synthese handeln muß. Auch der für Sesquiterpen-Synthesen äußerst hohe Reinigungsfaktor von 741 spricht für das Vorhandensein nur einer Synthese.

Ein letzter Beweis für die genannten Vermutungen wird durch die elektrophoretische Analyse der Synthese in Kapitel 4.4.1.1 (Seite 66) gegeben. In Kapitel 4.6.4 (Seite 107) wird außerdem auf den Cyclisierungsmechanismus der Synthese eingegangen, der ebenfalls auf eine Multi-Produkt-Synthese hinweist.

Es sei an dieser Stelle erwähnt, daß natürlich auch Überlegungen angestellt wurden, ob (+)- $\gamma$ -Gurjunen eventuell unter Assay-Bedingungen durch säurekatalysierte Umlagerung aus (-)- $\alpha$ -Gurjunen<sup>[109]</sup> hervorgeht (Abb. 56).



**Abb. 56** Hypothetische säurekatalysierte Umlagerung von (-)- $\alpha$ -Gurjunen zu (+)- $\gamma$ -Gurjunen.

Um dies ausschließen zu können, wurden Macroassays bei verschiedenen pH-Werten der Puffer durchgeführt (Tab. 5).

	Produktverteilung [%]		
	pH 6.8	pH 7.0	pH 7.2
(-)- $\alpha$ -Gurjunen	91	91	91
(+)- $\gamma$ -Gurjunen	9	9	9

**Tab. 5**  $\alpha/\gamma$ -Gurjunen-Produktverteilung in Macroassays mit verschiedenen pH-Werten.

Tab. 5 zeigt, daß ein variierender pH-Wert keinen Einfluß auf das Produktverhältnis hat. Bei einer säurekatalysierten Umlagerung wäre ein Anstieg der  $\gamma$ -Gurjunen Produktion bei niedrigeren pH-Werten zu erwarten gewesen. Dies wurde nicht beobachtet.

Weiterhin wurden Macroassays mit  $\alpha$ -Gurjunen-Synthase durchgeführt, bei denen während der Inkubation nicht das Substrat FDP, sondern unmarkiertes (-)- $\alpha$ -Gurjunen zugefügt wurde. Laut GC-Analyse war dieses  $\alpha$ -Gurjunen vor der Inkubation zu 99% rein. Das Assay wurde dann analog den Radio-Assays extrahiert und die Produkte per GC-MS analysiert. Es wurde nur (-)- $\alpha$ -Gurjunen gefunden (99%) und keinerlei (+)- $\gamma$ -Gurjunen. Dies ist der Beweis, daß  $\alpha$ -Gurjunen unter Assay-Bedingungen nicht zu  $\gamma$ -Gurjunen umgelagert wird. Das in Radio-Assays gefundene (+)- $\gamma$ -Gurjunen wird somit von der Multi-Produkt-Synthase (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase enzymatisch produziert.

## 4.4 Biochemische Charakterisierung der Synthesen

Im folgenden Kapitel sollen die biochemischen Eigenschaften der drei isolierten Sesquiterpen-Synthesen analysiert werden. Kapitel 4.4.1 geht auf die Bestimmung der molaren Masse ein, Kapitel 4.4.2 behandelt die Kinetik der Synthesen und Kapitel 4.4.3 widmet sich der Bestimmung von pH-Optima.

### 4.4.1 Bestimmung der molaren Masse

Die molare Masse eines Proteins wird gewöhnlich in Da (Dalton) angegeben. Ein Dalton ist das Äquivalent von einem zwölftel der Masse eines  $^{12}\text{C}$  Atoms. D.h. die Einheit 1 Da und 1 g sind äquivalent. Es hat sich allerdings eingebürgert, die Einheit Da anstelle von g für Proteine zu verwenden. Zur Bestimmung molarer Massen eignen sich zwei verschiedene Methoden: Gelelektrophorese und Gelfiltration.

Die Gelelektrophorese<sup>[110]</sup> eignet sich für die Bestimmung der molaren Masse von denaturierten Proteinen. Besonders bewährt hat sich die SDS-PAGE (Sodium-Dodecylsulfate Polyacrylamidegel-Electrophoresis). Da Proteine meist eine ausgeprägte tertiäre und quartäre Struktur besitzen, ist es sinnvoll für eine standardisierte Analyse die Proteine zunächst zu denaturieren. Mit Hilfe des Detergenz SDS (Sodium-Dodecylsulfate) werden die Proteine bei 95°C denaturiert und gehen in eine Stäbchenform über. Ca 1.4 mg SDS werden pro mg Protein an das Stäbchen gebunden und geben dem Protein so eine negative Nettoladung. Die Proteine werden dann mittels Gelelektrophorese getrennt. Je größer die Masse eines Proteins ist, desto länger ist es in der Stäbchenform und um so mehr Ladungen trägt es an seiner Außenseite. Das Trennprinzip der Gelelektrophorese beruht somit auf der unterschiedlichen Länge und Ladung von denaturierten Proteinen. Zusätzlich zu SDS wird 2-Mercaptoethanol zur Denaturierung der

Proteine eingesetzt. Dieses Reagenz reduziert Disulfid-Brücken der tertiären Struktur. Besteht ein Protein aus mehreren Untereinheiten (quartäre Struktur), so werden auch diese während des Denaturierungsvorgangs gespalten. Die denaturierende\* SDS-PAGE kann somit nur die molaren Massen von Proteinuntereinheiten bestimmen.

Als zusätzliche Bestimmungsmethode hat sich daher die Gelfiltration etabliert. Hierfür werden die Proteine nicht denaturiert, sondern mittels einer Gelmatrix in ihrem nativen Zustand voneinander getrennt. Die so erhaltenen Werte sind im Gegensatz zur SDS-PAGE allerdings mit zwei potentiellen Fehlern behaftet<sup>[61]</sup>:

- Durch verschiedene tertiäre und quartäre Strukturen können Proteine mit unterschiedlicher Masse dennoch gleiche Größe und Form haben und so eine gleiche Masse „vertauschen“.
- Native Proteine können Wechselwirkungen mit der Gelmatrix eingehen, die zu einer beschleunigten oder verlangsamten Elution führen und die Massen-Bestimmung verfälschen.

Andererseits besitzt die Gelfiltration den Vorteil, daß eluierte Proteine noch aktiv sind und in Enzymassays ihre Identität überprüft werden kann. Zudem ist die Gelfiltration in der Lage, die Gesamtmasse eines Proteins inklusive aller Untereinheiten zu bestimmen.

Für eine ausreichende Molmassen-Bestimmung müssen Gelelektrophorese und Gelfiltration miteinander kombiniert werden. Trotz gewisser Unzulänglichkeiten ist die Gelfiltration in der Lage, in guter Näherung die Molmasse zu bestimmen. Liegt diese im Bereich des Ergebnisses der Gelelektrophorese, so wird ein Monomer vorliegen, bzw. bei doppelter Masse ein Dimer usw.

#### 4.4.1.1 Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der molaren Massen per Gelelektrophorese wurde ein diskontinuierliches SDS-PAGE-System verwendet, das erstmals von *Laemmli*<sup>[106]</sup> eingeführt wurde. Das System besteht aus zwei miteinander verbundenen Polyacrylamidgelen. Das obere „Stacking-Gel“ dient der Auftragung der Proben und das untere „Resolving-Gel“ ist für die Proteintrennung verantwortlich. Beide Gele unterscheiden sich in Polyacrylamid-Konzentration, pH-Wert und Ionenstärke. Außerdem verwenden die Gele unterschiedliche mobile Ionen. Diese Diskontinuität dient dazu, große Probenvolumina im „Stacking-Gel“ zu konzentrieren, um dann im „Resolving-Gel“ eine höhere Auflösung zu erzielen.

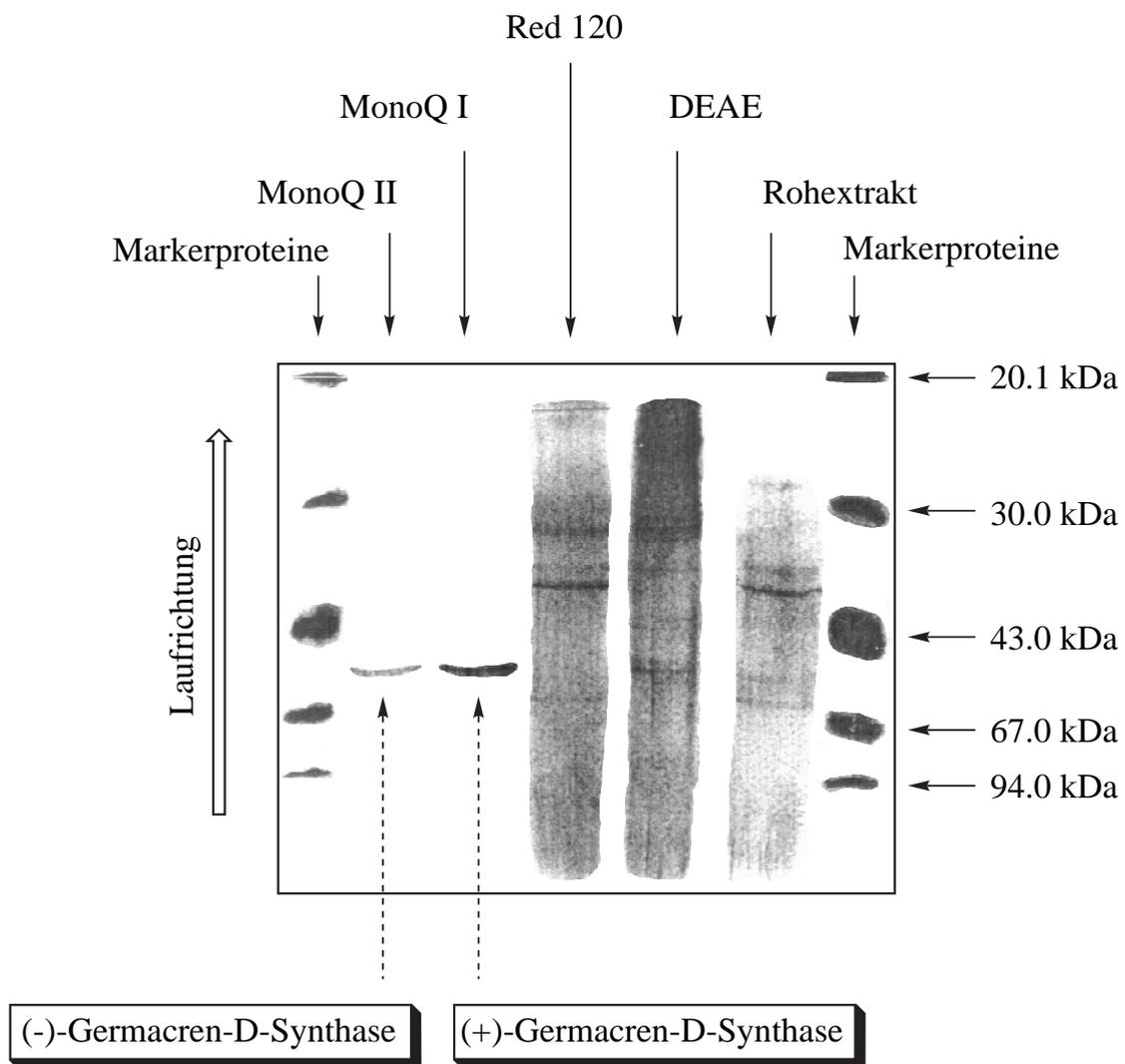
---

\* Es gibt durchaus auch Gelelektrophorese-Verfahren, die ohne die Denaturierung von Proteinen arbeiten (keine Verwendung von SDS und 2-Mercaptoethanol). Diese Verfahren dienen i.A. aber nicht der Bestimmung von molaren Massen.

Das Anfärben der getrennten Proteinbanden erfolgte mit Hilfe von „Silver-Staining“, das es ermöglicht auch noch Protein Mengen  $> 0.5$  ng zu detektieren<sup>[111]</sup>.

Zur Kalibrierung des Systems wurden fünf Proteine mit bekannter Molmasse parallel analysiert\*. Neben den jeweils aufgereinigten Enzymextrakten wurden auch weniger aufgereinigte Fraktionen (aus frühen Reinigungsschritten) und der Enzymrohextrakt analysiert, um eine Visualisierung der Proteinreinigung zu ermöglichen.

Abb. 57 zeigt das Gel für die Molmassen Bestimmung von (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase.



**Abb. 57** SDS-PAGE Gel für (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase-Isolierung (bedingt durch eine hohe Verdünnung des Rohextraktes vor Auftragung auf das Gel, zeigt die entsprechende Spur eine geringere Intensität als die Spur der saubereren DEAE-Fraktion).

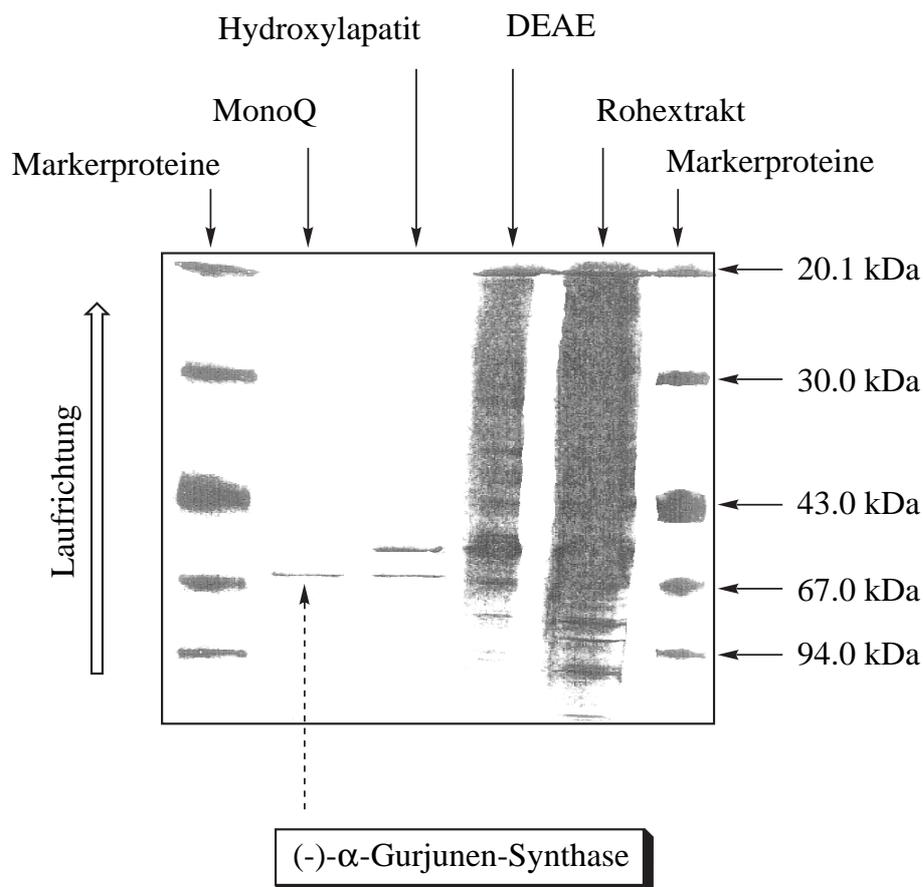
\* Verwendete Proteine: Soybean Trypsin Inhibitor (20.1 kDa); Carbonic Anhydrase (30 kDa); Ovalbumin (45 kDa); Rinder-Serumalbumin (67 kDa); Phosphorylase b (94 kDa).

Durch die Verwendung von „Silver-Staining“ ist das Gel sehr dunkel gefärbt. Der  $R_F$ -Wert von Proteinen ist bei der Gelelektrophorese umgekehrt proportional dem natürlichen Logarithmus der molaren Masse. Die Auswertung der  $R_F$ -Werte der Kalibrierungsproteine erfolgte daher mittels logarithmischer Regression. Es wurde folgende Gleichung für die Eichkurve bestimmt:

$$y [\text{Da}] = 3978.9 - 68802.7 \cdot \ln x \quad (x = R_F\text{-Wert})$$

Für (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase wurden jeweils  $R_F$ -Werte von 0.505 gemessen, daraus errechnet sich eine molare Masse von 51 kDa für beide Synthasen. Das Gel zeigt deutlich den abnehmenden Proteingehalt nach jedem Reinigungsschritt. Am Ende bleibt in den MonoQ-Fractionen der reinen (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase nur eine Proteinbande übrig. Dies entspricht einer Aufreinigung bis zur Homogenität der beiden Synthasen.

Abb. 58 zeigt das SDS-PAGE-Gel für die (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase.



**Abb. 58** SDS-PAGE-Gel für (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase-Isolierung.

Die logarithmische Regression ergab folgende Gleichung für die Eichkurve:

$$y \text{ [Da]} = 3506.6 - 64497 \cdot \ln x \quad (x = R_F\text{-Wert})$$

Für die (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase wurde ein  $R_F$ -Wert von 0.415 gemessen, dies entspricht einer molaren Masse von 60 kDa. Das Gel zeigt fernerhin, daß die Synthase bis zur Homogenität aufgereinigt wurde, da nach dem MonoQ-Reinigungsschritt nur noch eine Proteinbande sichtbar ist\*. Dieses Ergebnis dient als weiterer Beweis für die Hypothese, daß (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase eine Multi-Produkt-Synthase ist, die gleichzeitig in geringeren Mengen auch (+)- $\gamma$ -Gurjunen synthetisiert. Wäre die  $\alpha$ -Gurjunen-Synthase mit einer „echten“  $\gamma$ -Gurjunen-Synthase verunreinigt, so müßten zwei Proteinbanden im SDS-PAGE-Gel sichtbar sein. Da dies nicht der Fall ist, erscheint es logischer, von einer einzigen Multi-Produkt-Synthase auszugehen (siehe auch Kapitel 4.3.4, Seite 57).

#### 4.4.1.2 Gelfiltration

Die Gelfiltration aller drei Synthesen wurde mit einer Superdex75-Säule (*Pharmacia*) an einem FPLC-System durchgeführt. Es wurde jeweils die Enzymfraktion nach dem MonoQ-Reinigungsschritt verwendet.

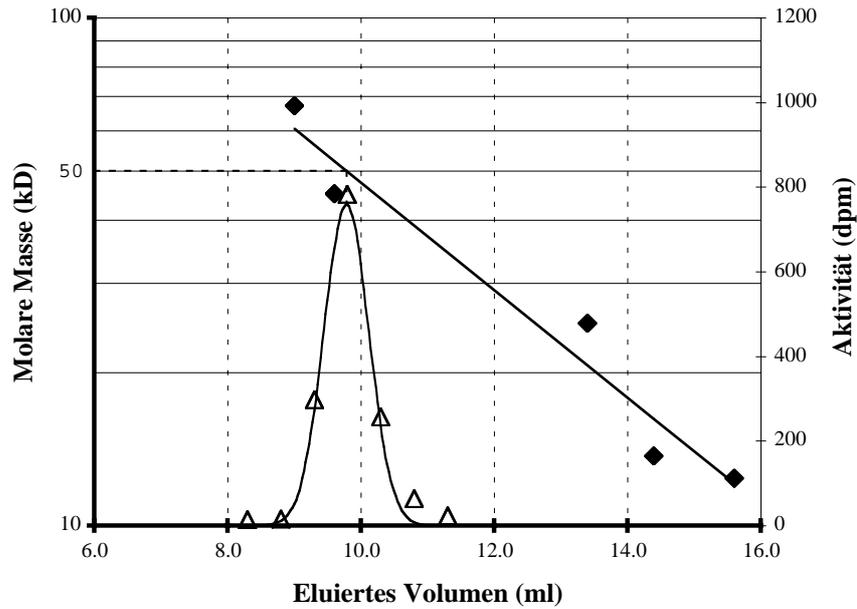
Zuerst wurde das System mit fünf Proteinen bekannter Molmasse kalibriert†. Da es sich bei den Proteinen um UV-aktive Substanzen handelt, erfolgte die Bestimmung ihres Elutionsvolumens mittels UV-Detektion bei 280 nm. Das Elutionsvolumen verhält sich umgekehrt proportional zum natürlichen Logarithmus der molaren Masse eines Proteins. Durch logarithmische Regression wurde eine Kalibrierungskurve errechnet. Logarithmische Auftragung dieser Gleichung ergab eine Gerade (siehe Gerade in Abb. 59). Das Elutionsvolumen der Synthesen konnte nicht per UV-Detektion erfolgen, da die Synthesen kein UV-aktives Chromophor besitzen. Hier mußte das eluierte Volumen fraktioniert aufgefangen und jede Fraktion per Microassay auf Synthase-Aktivität untersucht werden. Die Auftragung der gemessenen Radioaktivität gegen das Elutionsvolumen ergab einen Aktivitätspeak (siehe Peak in Abb. 59). Aus dem Schnittpunkt des Aktivitätspeaks mit der Kalibrierungsgerade kann die molare Masse der Synthase ermittelt werden.

Abb. 59 zeigt das Ergebnis für die (+)-Germacren-D-Synthase. Die molare Masse der (+)-Germacren-D-Synthase beträgt laut Gelfiltration 50 kDa.

---

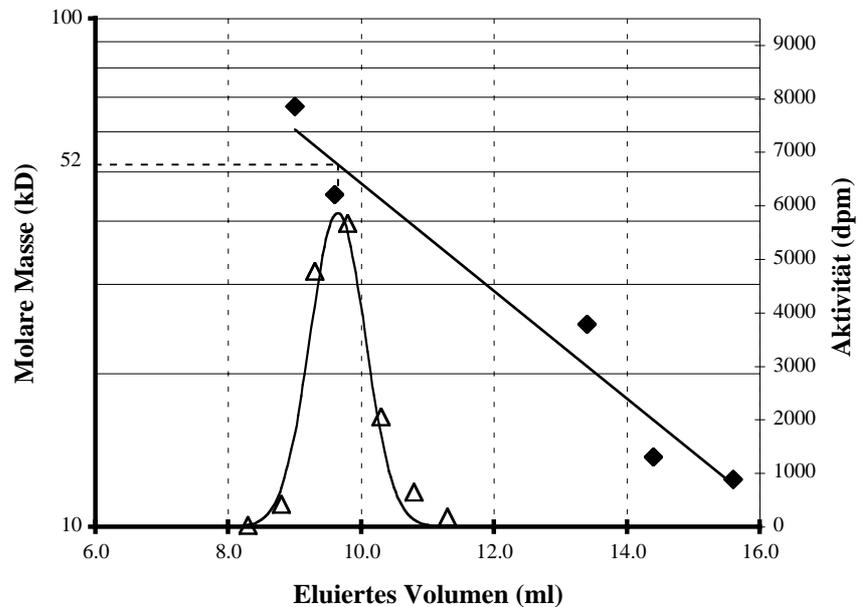
\* Es ist natürlich nicht vollkommen auszuschließen, daß nicht weitere Proteinbanden mit Mengen  $< 0.5$  ng vertreten sind, die durch „Silver-Staining“ nicht zu detektieren sind.

† Verwendete Proteine: Rinder-Serumalbumin (67 kDa); Ovalbumin (45 kDa);  $\alpha$ -Chymotrysinogen (25 kDa); Ribonuclease A (13.7 kDa); Cytochrom *c* (12.4 kDa).

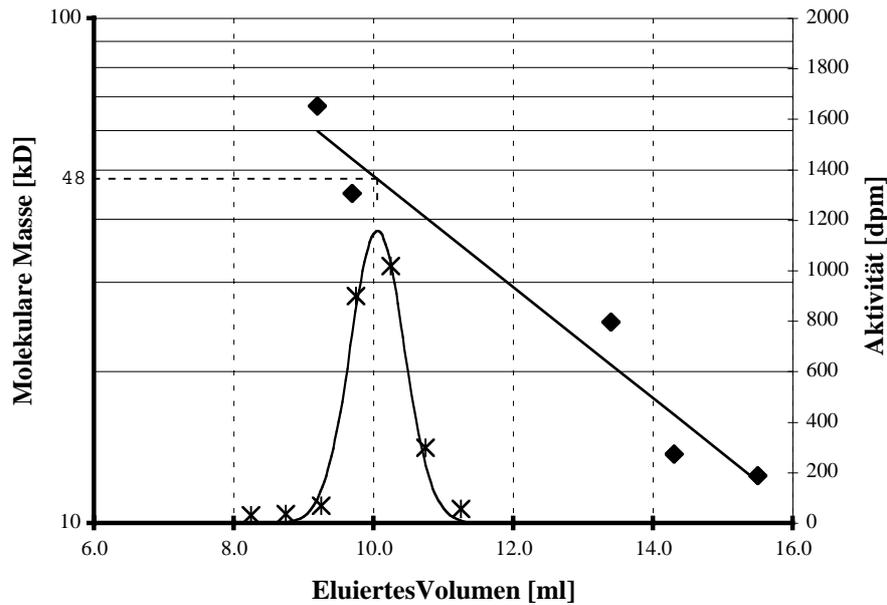


**Abb. 59** Bestimmung der molaren Masse von (+)-Germacren-D-Synthase mittels Gelfiltration.

Analog wurde die Bestimmung der molaren Massen von (-)-Germacren-D-Synthase (Abb. 60) und (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase (Abb. 61) durchgeführt.



**Abb. 60** Bestimmung der molaren Masse von (-)-Germacren-D-Synthase mittels Gelfiltration.



**Abb. 61** Bestimmung der molaren Masse von (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase mittels Gelfiltration.

Für (-)-Germacren-D-Synthase wurde eine molare Masse von 52 kDa bestimmt und für (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase eine Masse von 48 kDa.

Tab. 6 gibt eine Zusammenfassung der Molmassen-Bestimmung aller drei Synthesen per Gelelektrophorese und Gelfiltration:

	Gelelektrophorese [kDa]	Gelfiltration [kDa]
(+)-Germacren-D-Synthase	51	50
(-)-Germacren-D-Synthase	51	52
(-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase	60	48

**Tab. 6** Vergleich der Ergebnisse für die Molmassen-Bestimmung mit Hilfe von Gelelektrophorese und Gelfiltration.

Die Resultate für (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase stimmen bei beiden Bestimmungsmethoden gut miteinander überein. Es handelt sich also in beiden Fällen um monomere Synthesen. Die Werte für die (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase weichen etwas voneinander ab (48 kDa zu 60 kDa), dies kann durch die eingangs erwähnten Unzulänglichkeiten der Gelfiltration erklärt werden (Seite 65). Trotzdem liegen beide Werte nahe genug beieinander um zu beweisen, daß auch die  $\alpha$ -Gurjunen-Synthase ein monomeres Enzym ist.

## 4.4.2 Kinetische Studien

Wie bereits in Kapitel 3.2.3 (Seite 28) erläutert, besitzen Sesquiterpen-Synthasen nur ein Substrat (FDP). Daher konnte bei allen bislang isolierten Synthasen die Michaelis-Menten-Kinetik in ihrer einfachsten Form angewandt werden. Um zu prüfen, ob diese Kinetik auch auf die drei in dieser Dissertation isolierten Synthasen anwendbar ist, wurde zunächst ein „Linearitätsexperiment“ durchgeführt<sup>[66]</sup>. Ziel des Experiments ist es, zu prüfen, ob die Produktbildung linear von der Zeit abhängig ist. Dies ist eine notwendige Voraussetzung für die Anwendbarkeit der Michaelis-Menten-Kinetik. In dem Experiment werden die Synthasen mit ihrem Substrat inkubiert und die Reaktion nach unterschiedlichen Zeitintervallen abgebrochen, um die Konzentration der synthetisierten Produkte zu messen. Ergibt die graphische Auftragung der Ergebnisse eine Gerade, bzw. kann diese Gerade mittels linearer Regression ermittelt werden, so ist die Produktbildung linear proportional zu der Inkubationszeit.

Kapitel 4.4.2.1 beschreibt die Bestimmung der Linearität von (-)- $\alpha$ -Gurjunen-, (+)-Germacren-D- und (-)-Germacren-D-Synthase. In Kapitel 4.4.2.2 werden dann  $K_M$ -Werte und  $V_{max}$ -Werte aller drei Synthasen bestimmt.

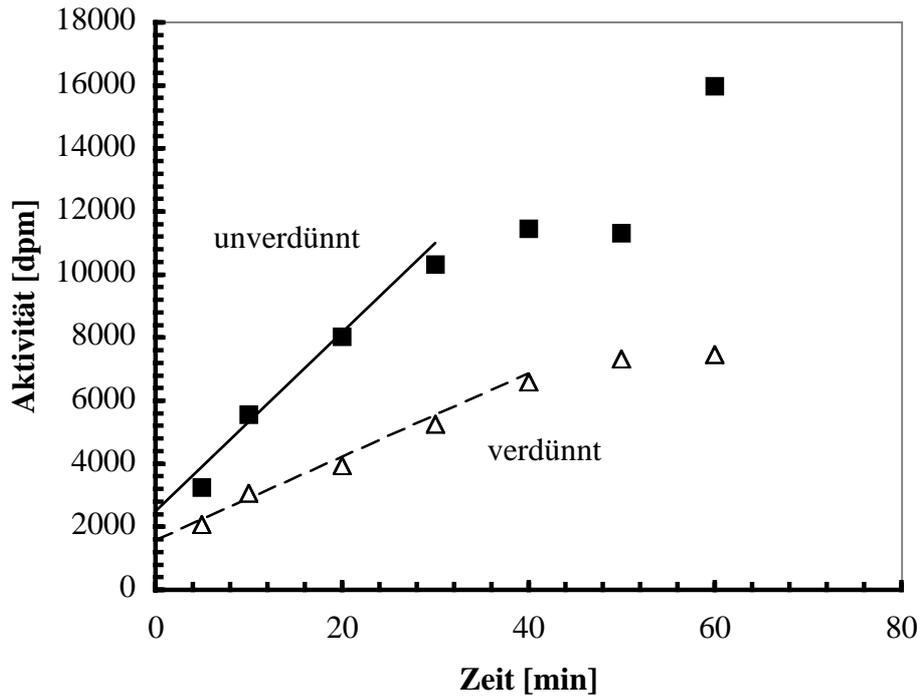
### 4.4.2.1 Linearitätsexperimente

Zur Bestimmung der linearen Produktbildung in Abhängigkeit von der Zeit wurden von (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase die MonoQ-Fraktion und von (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase die Hydroxylapatit-Fraktion verwendet. Die Enzymextrakte wurden in Microassays mit 2  $\mu$ M FDP (radioaktiv markiert) inkubiert und die Reaktion nach 5, 10, 20, 30, 40, 50 bzw. 60 min abgebrochen. Die Microassays wurden standardgemäß aufgearbeitet (siehe Seite 41) und die Konzentration der synthetisierten Produkte durch Messung ihrer Radioaktivität (in dpm) bestimmt.

Abb. 62 zeigt die graphische Auftragung der Ergebnisse für  $\alpha$ -Gurjunen-Synthase. Zur Bestimmung der Linearität wurde jeweils ein im Verhältnis 1:5 („unverdünnter“) und ein im Verhältnis 1:10 verdünnter Enzymextrakt („verdünnt“) verwendet. Der unverdünnte Extrakt zeigte eine lineare Produktbildung über 30 min, der verdünnte Extrakt über 40 min. Nach dieser Zeitspanne beginnt das Enzym zu denaturieren (Assay-Bedingungen: 30°C), so daß der Abfall an Produktbildung keine kinetische Ursache hat. Eine Linearität über 30 min ist allerdings völlig ausreichend für die Bestimmung der Michaelis-Menten Kinetik. Folgende Gleichungen wurden für die lineare Regression ermittelt:

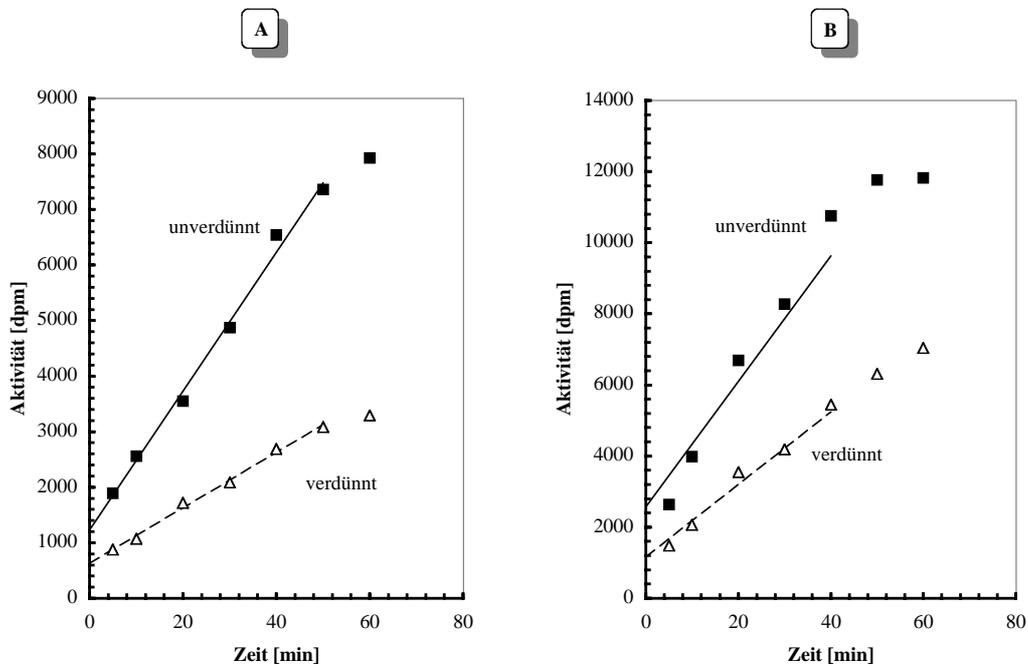
$$\text{Unverdünnter Extrakt: } y \text{ [dpm]} = 2489 + 283.76 \cdot x \text{ [min]}$$

$$\text{Verdünnter Extrakt } y \text{ [dpm]} = 1579.9 + 132.09 \cdot x \text{ [min]}$$



**Abb. 62** Bestimmung der Linearität für  $\alpha$ -Gurjunen-Synthase. Geraden sind jeweils nur für den Zeitraum der Linearität eingezeichnet.

Für (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase wurde ebenfalls eine lineare Produktbildung bewiesen. Abb. 63 zeigt die graphische Auswertung der Linearitätsexperimente.



**Abb. 63** Bestimmung der Linearität für (+)-Germacren-D-Synthase (A) und (-)-Germacren-D-Synthase (B). Geraden sind jeweils nur für den Zeitraum der Linearität eingezeichnet.

Die Assays zeigten lineare Produktbildung über 50 min {(+)-Germacren-D-Synthase} bzw. 40 min {(-)-Germacren-D-Synthase}. Somit konnte auch für diese Synthesen ein  $K_M$ -Wert bestimmt werden. Die lineare Regression der Geraden lieferte folgende Gleichungen (Tab. 7):

	verdünnt	unverdünnt
(+)-Germacren-D-Synthase	$y = 629.8 + 50,012 \cdot x$	$y = 1232.7 + 125,07 \cdot x$
(-)-Germacren-D-Synthase	$y = 1579.9 + 132.09 \cdot x$	$y = 2489.1 + 283.76 \cdot x$

**Tab. 7** Lineare Regression für die Linearitätsexperimente von (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase; [x] = min; [y] = dpm.

#### 4.4.2.2 Michaelis-Menten Kinetik der Synthesen

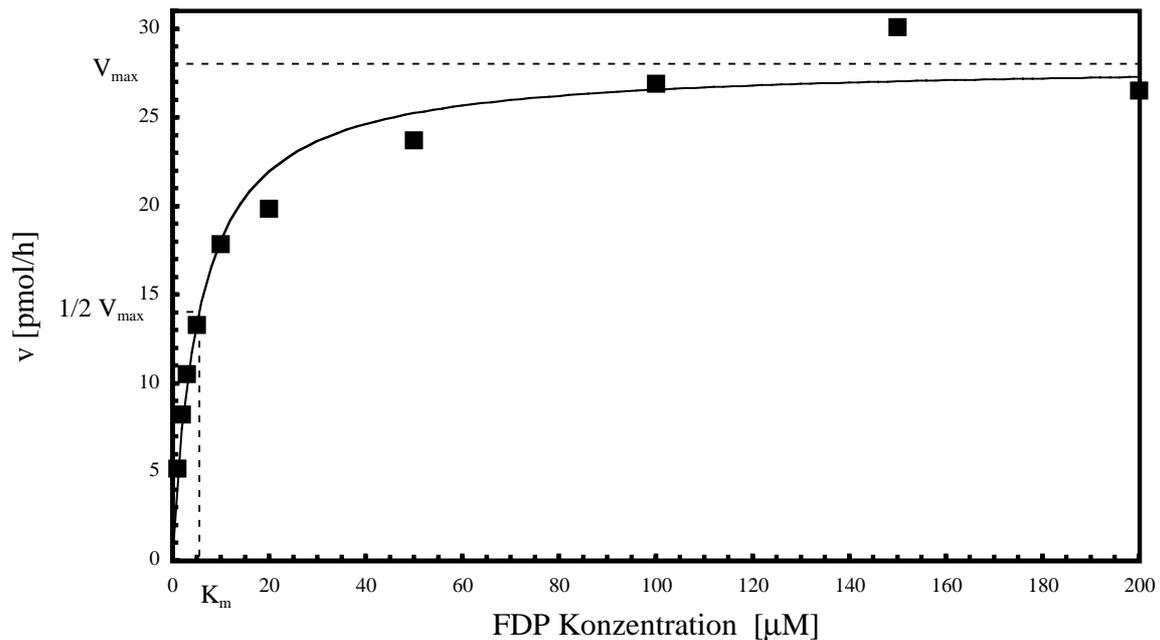
Da für alle drei Synthesen eine lineare Beziehung zwischen Produktbildung und Zeit bewiesen war, konnten nun die Parameter der Michaelis-Menten-Gleichung für die Synthesen bestimmt werden (Theorie der Michaelis-Menten-Kinetik: siehe Kapitel 3.2.3, Seite 28).

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Die Gleichung stellt den Zusammenhang zwischen Reaktionsgeschwindigkeit  $v$  und Substratkonzentration  $S$  dar. Somit wurden für alle Synthesen Microassays mit unterschiedlicher Substratkonzentration (radioaktiv markiertes FDP) angefertigt, die jeweils für 30 min inkubiert wurden (30 min war die Obergrenze, da nach dieser Zeit die Denaturierung der Enzyme begann, siehe Linearitätsexperimente, Kapitel 4.4.2.1). Die Konzentration synthetisierter Produkte wurde nach Aufarbeitung der Microassays durch Radioaktivitätsmessung bestimmt. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist als Konzentration/Zeit definiert, da alle Inkubationen 30 min dauerten, konnte die Reaktionsgeschwindigkeit in pmol/h angegeben werden\*.

Graphische Auftragung von  $v$  gegen  $[S]$  liefert eine hyperbolische Kurve<sup>[110]</sup> (siehe Abb. 64 für (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase).

\* Es wurde mit einem tritiiertem FDP gearbeitet, daß eine Aktivität von  $1.1 \cdot 10^5$  dpm/nmol besitzt; d.h. der Umrechnungsfaktor von dpm zu pmol beträgt 0.009. Die nach einem Microassay gemessenen dpm-Werte werden also mit 0.009 multipliziert, um die Konzentration der synthetisierten Sesquiterpene in pmol anzugeben. Da die Inkubationszeit 30 min betrug, muß der erhaltene Wert mit Faktor 2 multipliziert werden, um die Reaktionsgeschwindigkeit in pmol/h auszudrücken. Zusammengefaßt gilt:  $[dpm] \cdot 0.018 = [pmol/h]$ .



**Abb. 64** Bestimmung des  $K_M$ -Wertes für (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase ( $K_M = 5.54 \mu\text{M}$ ).

Eine computergestützte Analyse\* der Meßdaten lieferte eine sehr exakte Berechnung der Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  und  $V_{\text{max}}$ :

$$K_M = 5.54 \mu\text{M}$$

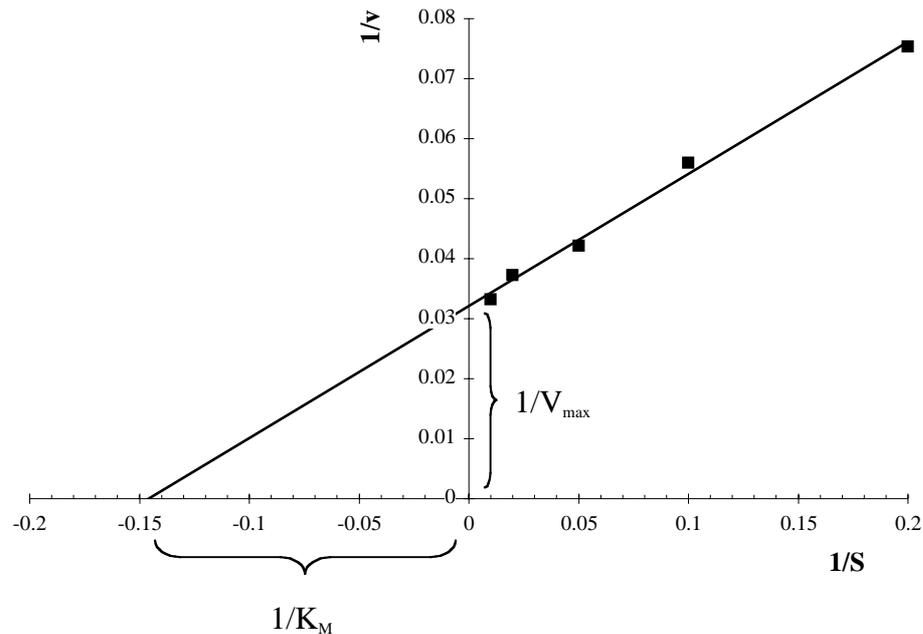
$$V_{\text{max}} = 28.03 \text{ pmol/h}$$

In der älteren Literatur wird zur Bestimmung von  $K_M$ -Werten häufig ein Lineweaver-Burk-Diagramm verwendet<sup>[72]</sup>, das die reziproken Werte von  $v$  und  $[S]$  gegeneinander aufträgt. Der Nachteil dieser Auswertung ist, daß Meßdaten von kleinen Substratkonzentrationen überbewertet werden, obwohl gerade jene Meßdaten mit den größten Fehlern behaftet sind. Die Lineweaver-Burk-Gleichung lautet:

$$\frac{1}{v} = \frac{1}{V_{\text{max}}} + \frac{K_M}{V_{\text{max}}} \cdot \frac{1}{[S]}$$

Auch für die  $\alpha$ -Gurjunen-Synthase wurde ein Lineweaver-Burk-Diagramm erstellt (Abb. 65).

\* Die Analyse wurde mit der Software Slidewrite durchgeführt. Für die Berechnung wurde das Curve-Fitter Modul „1-Site-Ligand“ gewählt, das mit dem Gleichungstyp der Michaelis-Menten-Gleichung identisch ist.



**Abb. 65** Lineweaver-Burk-Diagramm für (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase.

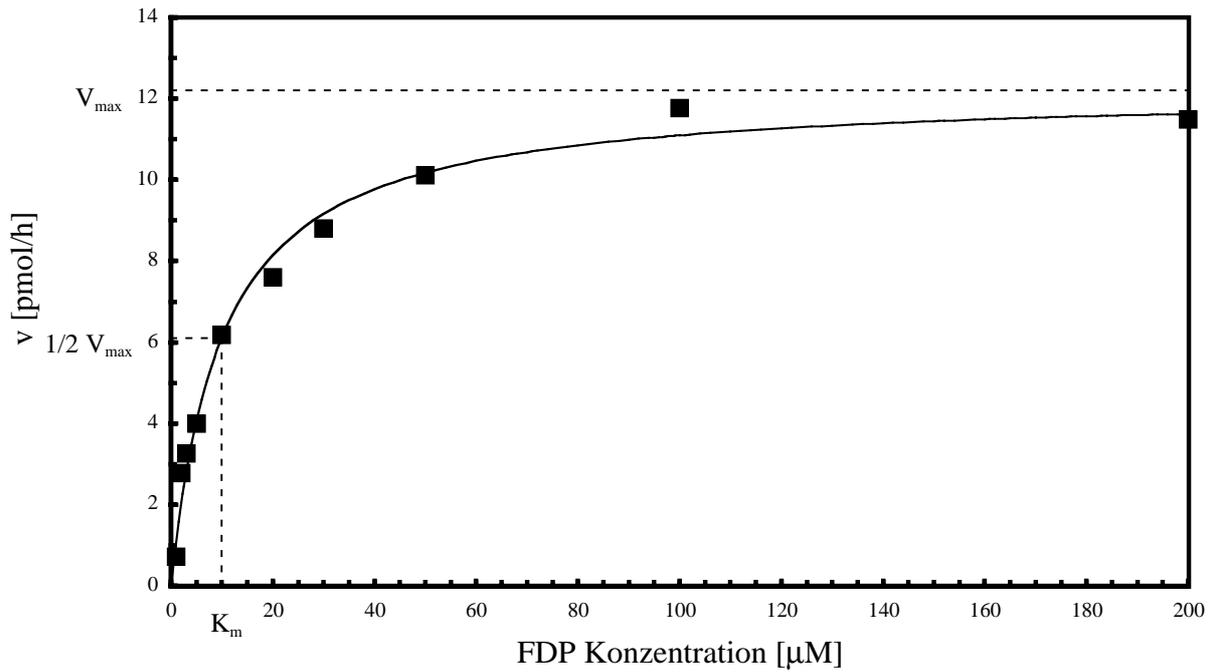
Die Lineweaver-Burk-Gleichung ist eine lineare Gleichung vom Typ  $y = ax + b$ . Die graphische Auftragung zeigt erwartungsgemäß eine Gerade, deren Gleichung per linearer Regression ermittelt werden kann. Im Fall der  $\alpha$ -Gurjunen-Synthase lautet die Gleichung:

$$y = 0.2201 \cdot x + 0.032$$

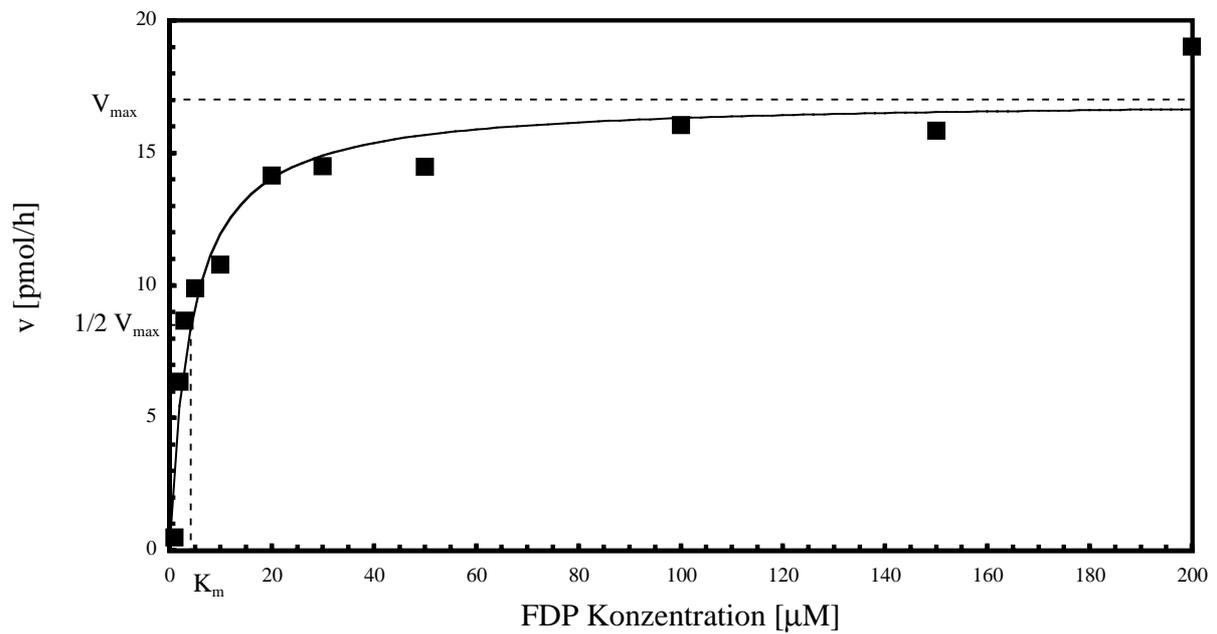
Mit Hilfe dieser Konstanten können  $K_M$  und  $V_{\max}$  ermittelt werden. Auf diesem Wege wurde für  $\alpha$ -Gurjunen-Synthase ein  $K_M$ -Wert von  $6.88 \mu\text{M}$  und ein  $V_{\max}$  von  $31.25 \text{ pmol/h}$  errechnet. Beide Werte liegen im Bereich der Werte, die aus dem Michaelis-Menten-Diagramm per Computeranalyse ermittelt wurden (s.o.). Wegen der genannten Nachteile der Lineweaver-Burk-Gleichung wird diese gewöhnlich nicht mehr verwendet. In der heutigen Literatur werden ausschließlich die Ergebnisse aus dem Michaelis-Menten-Diagramm angegeben\*.

Die graphische Auswertung der kinetischen Studien für (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase sind in Abb. 66 und Abb. 67 wiedergegeben (Michaelis-Menten-Diagramme). Abb. 68 zeigt als Vergleich die Lineweaver-Burk-Diagramme für beide Synthesen.

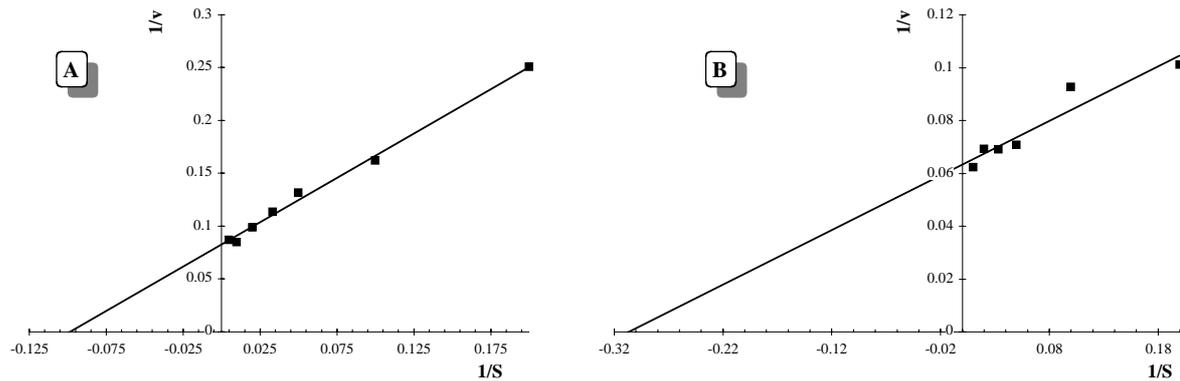
\* Die Lineweaver-Burk-Gleichung hatte ihre Berechtigung in der Zeit als computergestützte Auswertungen von Gleichungen noch nicht allgemein zugänglich waren. Trotzdem ist ein Vergleich der beiden Möglichkeiten auch heute noch interessant.



**Abb. 66** Michaelis-Menten Diagramm für (+)-Germacren-D-Synthase ( $K_M = 9.97 \mu\text{M}$ ).



**Abb. 67** Michaelis-Menten Diagramm für (-)-Germacren-D-Synthase ( $K_M = 4.24 \mu\text{M}$ ).



**Abb. 68** Lineweaver-Burk-Diagramme von (+)-Germacren-D-Synthase (A) und (-)-Germacren-D-Synthase (B).

Tab. 8 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse für alle drei Synthasen.

	(+)-Germacren-D-Synthase	(-)-Germacren-D-Synthase	(-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase
$K_M$ (aus Michaelis-Menten-Diagramm)	9.97 $\mu\text{M}$	4.24 $\mu\text{M}$	5.54 $\mu\text{M}$
$V_{\max}$ (aus Michaelis-Menten-Diagramm)	12.20 pmol/h	17.00 pmol/h	28.03 pmol/h
Lineare Regression für Lineweaver-Burk-Diagramm	$y = 0.8391 \cdot x + 0.082$	$y = 0.2065 \cdot x + 0.063$	$y = 0.2201 \cdot x + 0.032$
$K_M$ (aus Lineweaver-Burk-Diagramm)	10.17 $\mu\text{M}$	3.26 $\mu\text{M}$	6.88 $\mu\text{M}$
$V_{\max}$ (aus Lineweaver-Burk-Diagramm)	12.12 pmol/h	15.80 pmol/h	31.25 pmol/h

**Tab. 8** Zusammenfassung der kinetischen Untersuchungen an (+)-Germacren D-, (-)-Germacren-D- und (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase.

Die Bestimmung von  $K_M$ -Werten dient hauptsächlich der Charakterisierung der Synthasen. Die  $K_M$ -Werten haben nur eine sehr bedingte Aussagekraft über die Mechanismen der untersuchten Synthasen. Es kann die Aussage getroffen werden, daß (-)-Germacren-D-Synthase eine höhere Affinität zu dem Substrat FDP hat als (+)-Germacren-D-Synthase, da ihr  $K_M$ -Wert niedriger ist<sup>[72]</sup>. Diese Feststellung sagt je-

doch nichts über die Mechanismen der Enzyme aus. Wichtig ist das Ergebnis allerdings im Hinblick auf die Charakterisierung der Enzyme. Es zeigt zweifelsfrei, daß zwei unterschiedliche Synthesen isoliert wurden und keine Artefakte einer einzigen Synthese.

### 4.4.3 pH-Optimum

Zur biochemischen Charakterisierung einer Sesquiterpen-Synthase zählt auch die Bestimmung ihres pH-Optimums. Ein Teil des aufgereinigten Enzymextraktes wird im Verhältnis 1:5 mit einem Puffer verdünnt, der zuvor auf einen bestimmten pH-Wert eingestellt wurde. Für die (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase wird erneut die Hydroxylapatit-Fraktion verwendet, für (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase die MonoQ-Fraktionen. So wird sichergestellt, daß jeweils nur eine isolierte Sesquiterpen-Synthase untersucht wird. Die Mischung wird analog einem Microassay mit [ $^3\text{H}$ ]-FDP inkubiert und anschließend aufgearbeitet. Messung der Radioaktivität in den Assay-Extrakten ermöglicht es, die Enzymaktivität bei verschiedenen pH-Werten zu analysieren.

Die graphische Auftragung gibt gewöhnlich eine Glockenkurve (Gauß'sche Kurve), deren Maximum das pH-Optimum definiert.

Es wurden Pufferlösungen mit pH-Werten im Bereich pH 5.5 bis pH 9.0 getestet. Diese breite Region von pH-Werten kann nicht von einem einzigen Puffersystem realisiert werden. Daher wurden verschiedene Puffersysteme eingesetzt:

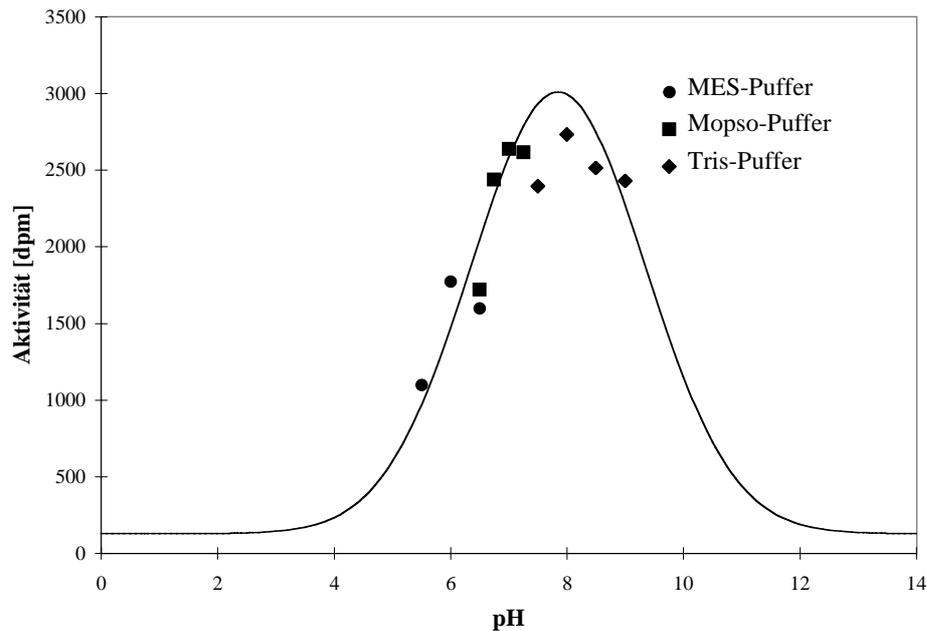
- pH 5.5 – pH 6.5: MES-Puffer (2-Morpholinoethansulfonsäure)
- pH 6.5 – pH 7.5: Mopso-Puffer (3-[N-Morpholino]-2-hydroxy-propansulfonsäure)
- pH 7.5 – pH 9.0: Tris-Puffer (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)

Die Bereiche der pH-Werte überschneiden sich bei pH 6.5 und pH 7.5, dies soll veranschaulichen, daß ein pH-Optimum nicht ausschließlich vom pH-Wert, sondern auch vom verwendeten Puffer abhängig ist. Als pH-Optimum wird trotzdem stets der Mittelwert aus allen drei Puffersystemen genommen\*.

Abb. 69 zeigt die graphische Auswertung der pH-Optimum-Bestimmung für die (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase.

---

\* Die Bestimmung eines pH-Optimums hat nur begrenzte Aussagekraft über die Wirkungsweise der untersuchten Enzyme, sie dient in erster Linie der Charakterisierung der Synthesen, um einen Vergleich mit anderen Synthesen zu ermöglichen.



**Abb. 69** Bestimmung des pH-Optimums für (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase (pH 7.8).

Da der Verlauf des pH-Optimums durch eine Gauß'sche Kurve beschrieben werden kann, gilt folgende Gleichung:

$$y = a + b \cdot e^{\left[-0.5 \cdot \left(\frac{x-c}{d}\right)^2\right]}$$

Die Variable  $y$  entspricht der Aktivität und  $x$  dem pH-Wert. Die Konstante  $c$  liefert somit das pH-Optimum. Mit Hilfe einer computergestützten Analyse\* der Meßergebnisse wurden folgende Konstanten für (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase gefunden:

$$a = 127.29$$

$$b = 2881.2$$

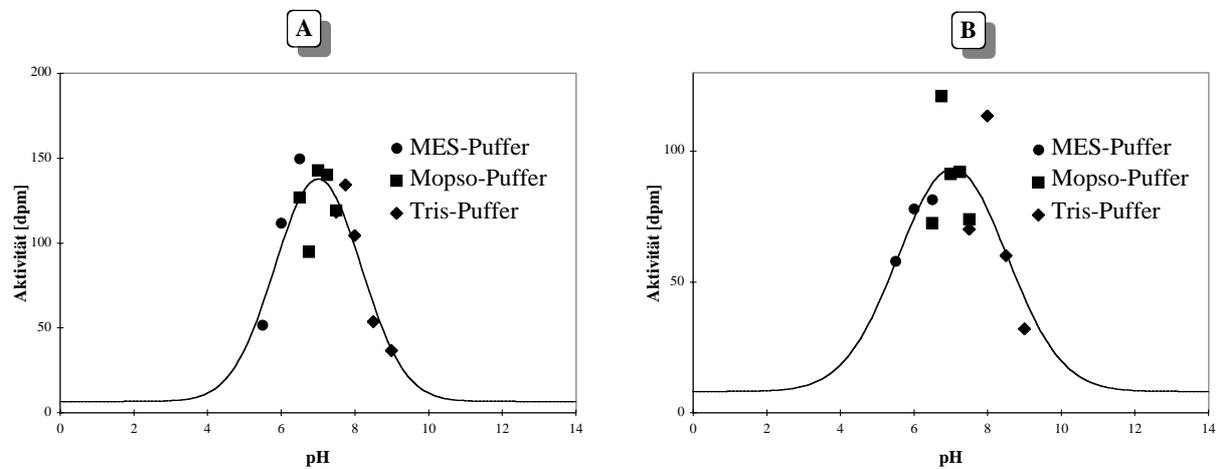
$$c = 7.84$$

$$d = 1.49$$

Das pH-Optimum für die  $\alpha$ -Gurjunen-Synthase liegt bei pH 7.8 (gerundet). Die Grafik läßt erkennen, daß es sich um ein sehr breites pH-Optimum handelt. Im Falle der  $\alpha$ -Gurjunen-Synthase wird noch die Hälfte der maximalen Aktivität bei pH 6.35 und pH 9.33 beobachtet. Diese „pH/2-Werte“ werden rechnerisch aus den Wendepunkten der Gauß-Funktion ermittelt. Sie sind definiert als  $\text{pH}/2 = c \pm d$ . Dies ist ein typisches Ergebnis für Sesquiterpen-Synthasen. Ihr pH-Optimum liegt stets im Bereich von pH 6.0 bis pH 8.0 und ist relativ breit, d.h. die Synthasen sind auch bei höheren, bzw. niedrigeren pH-Werten noch funktionsfähig.

\* Es wurde die Software „Slidewrite“ verwendet mit dem Curve-Fitter-Modul „Gaussian“.

Die graphische Auswertung der pH-Optimum-Bestimmung für (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase ist in Abb. 70 wiedergegeben.



**Abb. 70** Bestimmung des pH-Optimums für A: (+)-Germacren-D-Synthase (pH 7.0) und B: (-)-Germacren-D-Synthase (pH 7.1).

Ergebnisse:

- (+)-Germacren-D-Synthase: pH 7.0;                      pH/2: pH 5.8 und pH 8.2
- (-)-Germacren-D-Synthase: pH 7.1;                      pH/2: pH 5.6 und pH 8.5

Tab. 9 gibt die Bestimmung der Konstanten für die Gauß-Funktion beider Synthesen an.

	a	b	c	d
(+)-Germacren-D-Synthase	6.53	131.1	7.01	1.17
(-)-Germacren-D-Synthase	8.07	85.3	7.06	1.48

**Tab. 9** Konstanten der Gauß-Funktion für das pH-Optimum von (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase.

Auch (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase zeigen ein sehr breites pH-Optimum, das im erwarteten Bereich um pH 7 liegt. Interessanterweise haben beide Synthesen ein sehr ähnliches pH-Optimum. Zusammen mit dem Ergebnis, daß auch ihre Molmassen (Kapitel 4.4.1, Seite 65) fast identisch sind, läßt sich die Vermutung anstellen, daß es sich um sehr ähnliche Enzyme handelt. Andererseits beweist der  $K_M$ -Wert beider Synthesen, daß sie nicht völlig identisch sein können (Kapitel 4.4.2.2, Seite 77), auch die Tatsache, daß beide Synthesen per MonoQ-Chromatographie voneinander getrennt werden können (Kapitel

4.3.2, Seite 50), zeigt, daß es gewisse Unterschiede gibt. Wie sehr sich beide Synthesen letztendlich unterscheiden, kann nur durch Ermittlung ihrer Primärstruktur (Aminosäuresequenz-Analyse) ermittelt werden. Auf diesem Weg wäre es möglich, das aktive Zentrum zu lokalisieren. Auch die Ermittlung der dreidimensionalen tertiären und quartären Struktur durch kristallographische Methoden würde Unterschiede beider Synthesen sichtbar machen. Zur Ermittlung von Primär- und Tertiärstruktur ist aber zunächst die Isolierung der cDNA beider Synthesen nötig (siehe Kapitel 3.4, Seite 34). Diese Aufgabe war allerdings nicht mehr Bestandteil der vorliegenden Dissertation.

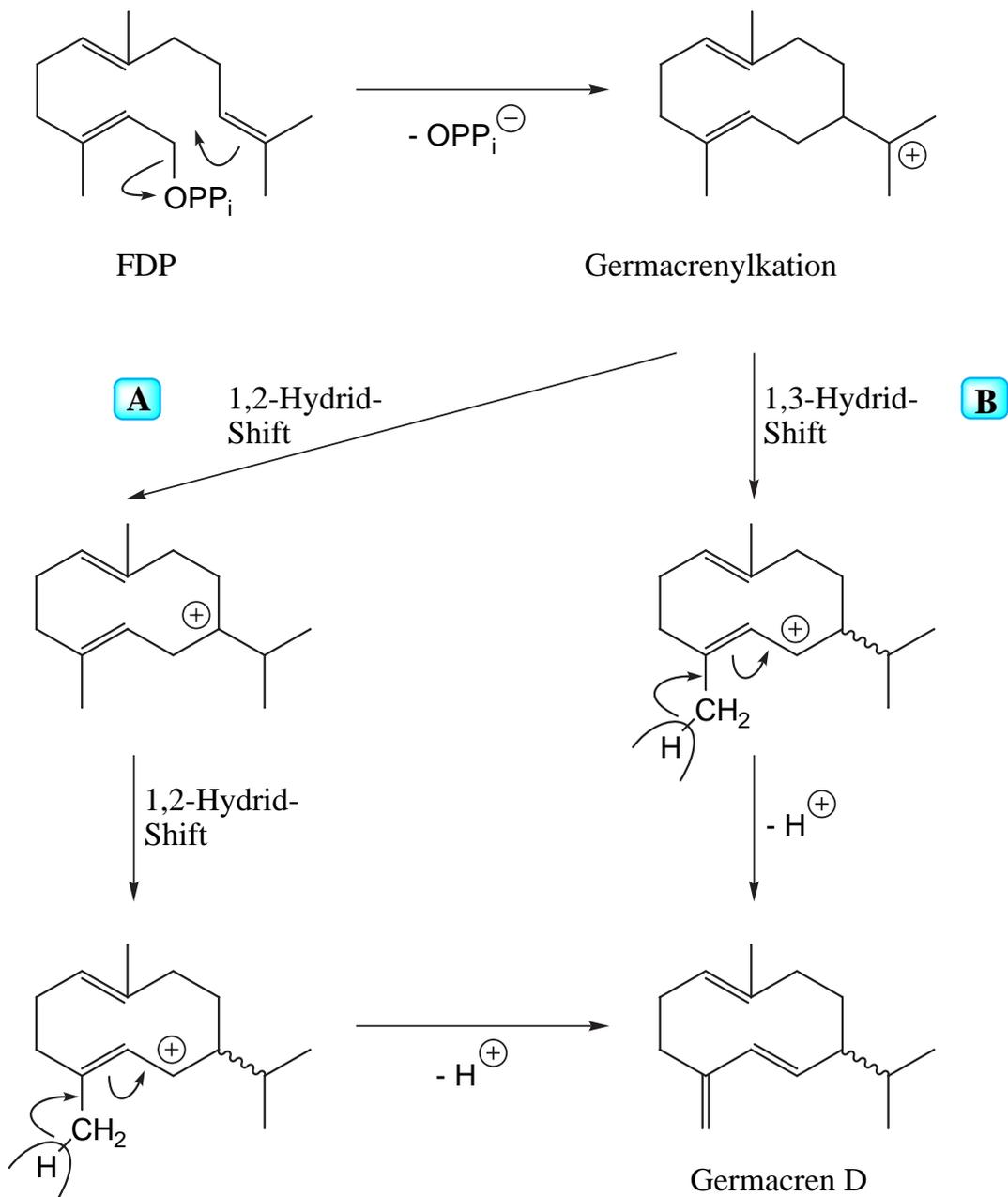
## 4.5 Synthese von deuterierten Farnesyldiphosphaten

Nach der erfolgreichen Isolierung von (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase sollten deren Cyclisierungsmechanismen analysiert werden (siehe Kapitel 4.6, Seite 91). Für diesen Zweck mußten die Synthesen mit deuterierten Substratanalogen (deuterierte Farnesyldiphosphate) inkubiert werden, um anschließend die Deuterium-Position innerhalb der synthetisierten Sesquiterpene bestimmen zu können (z.B. mittels Massenspektrometrie).

Zunächst mußten Überlegungen angestellt werden, welche Cyclisierungsmechanismen für die Synthese von (+)- und (-)-Germacren D plausibel sind. Danach konnte entschieden werden, an welchen FDP-Positionen Deuterium-Markierungen sinnvoll sind. Abb. 71 zeigt zwei mögliche Cyclisierungsmechanismen, die zu Germacren D führen.

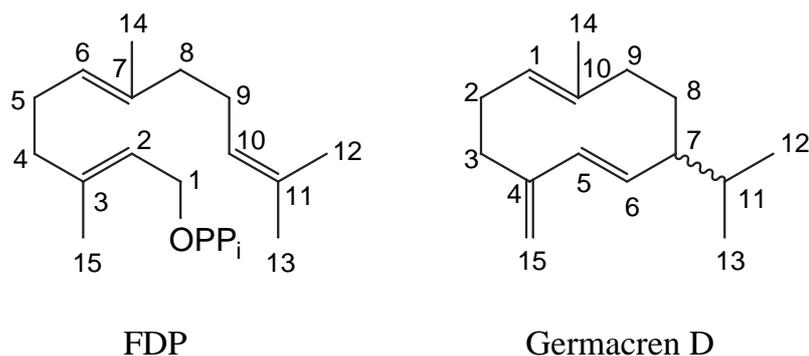
Auf beiden Wegen wird zunächst unter Abspaltung von anorganischem Diphosphat ein Germacrenylkation gebildet. Dies kann dann entweder seine positive Ladung durch einen doppelten 1,2-Hydrid-Shift verschieben (Weg A) oder durch einen einfachen 1,3-Hydrid-Shift (Weg B). Letzter Schritt beider Mechanismen ist die Abspaltung eines Protons unter Bildung von Germacren D. Über die Stereochemie der Mechanismen lassen sich nur schwer Vermutungen anstellen. Welcher Weg für (+)- bzw. (-)-Germacren D realisiert ist, kann daher nur auf experimentellem Wege ermittelt werden. Zwar deuten Computeranalysen (siehe Molecular Modelling, Kapitel 4.6.2, Seite 100) darauf hin, daß (+)-Germacren D mittels eines doppelten 1,2-Hydrid-Shifts und (-)-Germacren D via 1,3-Hydrid-Shift synthetisiert wird, doch haben solche Analysen nur geringe Beweiskraft ohne zusätzliche experimentelle Befunde.

Andere Mechanismen schienen nur wenig plausibel. Zudem wurden die beiden vorgestellten Mechanismen auch schon von *Niwa et al.*<sup>[18]</sup> postuliert. Es konnte also davon ausgegangen werden, daß zumindest einer oder auch beide Wege für die Bildung von (+)- und (-)-Germacren D verantwortlich sind.



**Abb. 71** Mögliche Cyclisierungsmechanismen, die von FDP zu Germacren D führen A: Doppelter 1,2-Hydrid-Shift und B: einfacher 1,3-Hydrid-Shift.

Da die entscheidenden Schritte beider Cyclisierungswege an den Kohlenstoffatomen 1, 10 und 11 von FDP stattfinden (Abb. 72), erschien es am aussichtsreichsten, FDP-Analoga zu synthetisieren, die an jenen Positionen Deuterium anstelle von Protonen tragen. Je nach Mechanismus müßten diese Deuterium-Markierungen dann in Position 6, 7 oder 11 von Germacren D zu finden sein (Abb. 72).



**Abb. 72** Systematische Nummerierung der Kohlenstoffatome von FDP und Germacren D.

Daher sollten folgende FDP-Analoga synthetisiert werden:

- (*IR*)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP,
- (*IS*)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP und
- [10-<sup>2</sup>H]-FDP.

Da es sich bei den Protonen an C-1 von FDP um prochirale Protonen handelt, mußten die beiden möglichen Enantiomere (*IR*)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP und (*IS*)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP synthetisiert werden. Für den Fall, daß diese Substrate keine ausreichenden Ergebnisse liefern, erschien es sinnvoll, zusätzlich [1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-FDP zu synthetisieren.

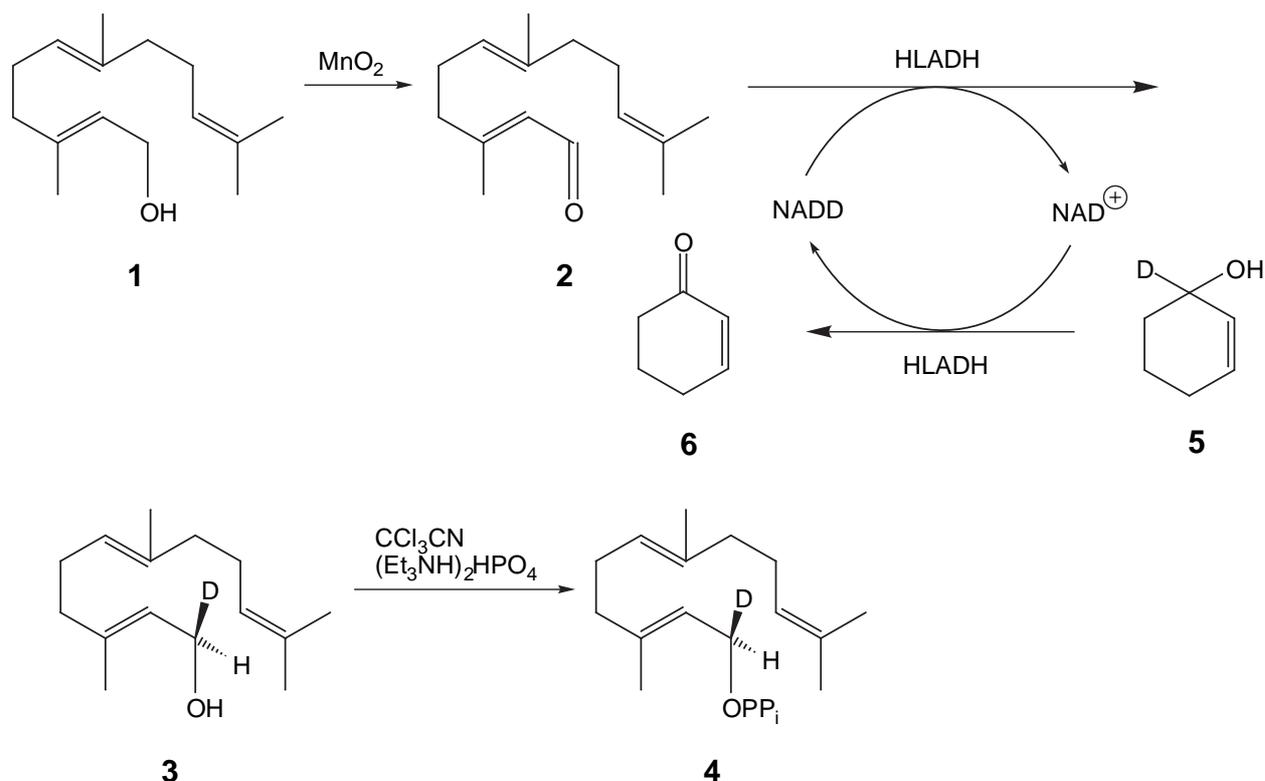
Die folgenden Kapitel gehen auf die chemischen Synthesen der vorgestellten Verbindungen ein.

#### 4.5.1 Synthese von (*IR*)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP

Die Synthese der gesuchten Verbindung wurde bereits von *Cane* demonstriert<sup>[9]</sup>. Abb. 73 zeigt den Synthesepfad für die Zielverbindung.

Ausgangsverbindung ist kommerziell erhältliches (*E,E*)-Farnesol **1**, das zu Farnesal **2** oxidiert wird. Oxidationsmittel ist aktiviertes Mangandioxid<sup>[112]</sup>; alternativ kann auch Pyridiniumdichromat als Oxidationsmittel verwendet werden<sup>[113]</sup>. Im nächsten Schritt wird **2** enantioselektiv zu (*IR*)-Farnesol **3** reduziert. Diese Reaktion wird enantioselektiv durch das Enzym HLADH (Horse-Liver-Alcohol-Dehydrogenase) katalysiert<sup>[9]</sup>. Co-Faktor ist NAD<sup>+</sup>, das von dem Co-Substrat [1-<sup>2</sup>H]-Cyclohexenol **5** Deuterium auf Farnesal überträgt<sup>[45]</sup>. Somit wird *in situ* deuteriertes NADH („NADD“) erzeugt, das als eigentliches Reduktionsmittel des Farnesals dient. Sowohl die Oxidation des Cyclohexenols, als auch die Reduktion von Farnesal werden von HLADH katalysiert<sup>[114]</sup>. HLADH zeichnet sich durch eine hohe Enantioselektivität, Regioselektivität und Substratazeptanz aus<sup>[115]</sup>. Ein Vorteil der enzymatisch katalysierten Reaktion liegt in ihren milden Reaktionsbedingungen, die eine Isomerisierung von (*E,E*)-Farnesol zu (*2E,6Z*)-Farnesol ausschließen. Da

bereits detaillierte Studien über den Reaktionsmechanismus von HLADH durchgeführt wurden, ist es möglich Aussagen über die Stereochemie der gebildeten Produkte zu treffen<sup>[116]</sup>. Im letzten Schritt wird **3** mit anorganischem Diphosphat verestert.

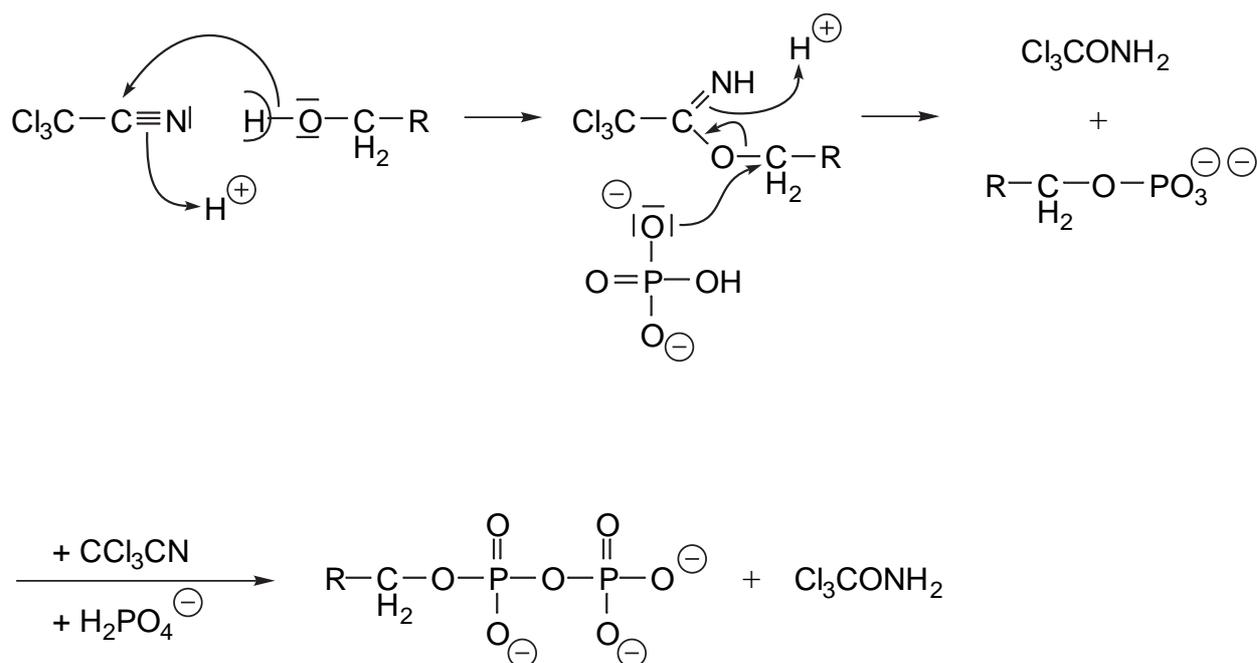


**Abb. 73** Synthesepfad für (1R)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP.

Die Veresterung erfolgt nach der Methode von *Cramer* und *Böhm*<sup>[117]</sup>, mit einer Optimierung nach *Popják et al.*<sup>[118]</sup>. Reagenz ist Di-triethylammonium-orthophosphat. Zusätzlich dient Trichloroacetonitril als spezifisches Veresterungsmittel für Phosphorsäuren. Den möglichen Reaktionsmechanismus zeigt Abb. 74.

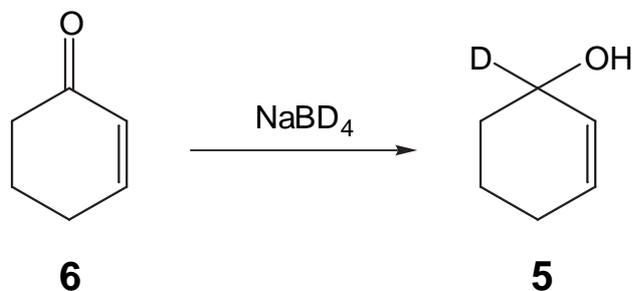
Ein Nachteil der Reaktion sind die extrem niedrigen Ausbeuten, da in vergleichbaren Mengen auch die entsprechenden Mono- und Triphosphate synthetisiert werden. Andererseits ist es die schonendste Methode für die Phosphorylierung von Alkoholen. Bei anderen Methoden besteht stets die Gefahr einer Racemisierung an Position 1<sup>[119]</sup>. Nach der Reaktion können die verschiedenen Phosphate per HPLC<sup>[120]</sup> (an einer RP-18-Phase) oder mit Hilfe von Anionenaustauscher-Chromatographie<sup>[121]</sup> voneinander getrennt werden\*.

\* Beide Methoden wurden ausprobiert. Da die Anionenaustauscher-Chromatographie deutlich bessere Ergebnisse lieferte (und gegenüber der HPLC wesentlich kostengünstiger zu betreiben war), wurde ihr der Vorzug gegeben.



**Abb. 74** Möglicher Reaktionsmechanismus für die Veresterung von Alkoholen mit Diphosphat.

Das zusätzlich für die Reaktion benötigte [1-<sup>2</sup>H]-Cyclohexenol **5** wird aus kommerziell erhältlichem Cyclohexenon **6** dargestellt (Abb. 75). Reduktionsmittel ist Natriumbordeuterid, das als Deuterium-Quelle der Synthese dient<sup>[122]</sup>.



**Abb. 75** Synthese von [1-<sup>2</sup>H]-Cyclohexenol.

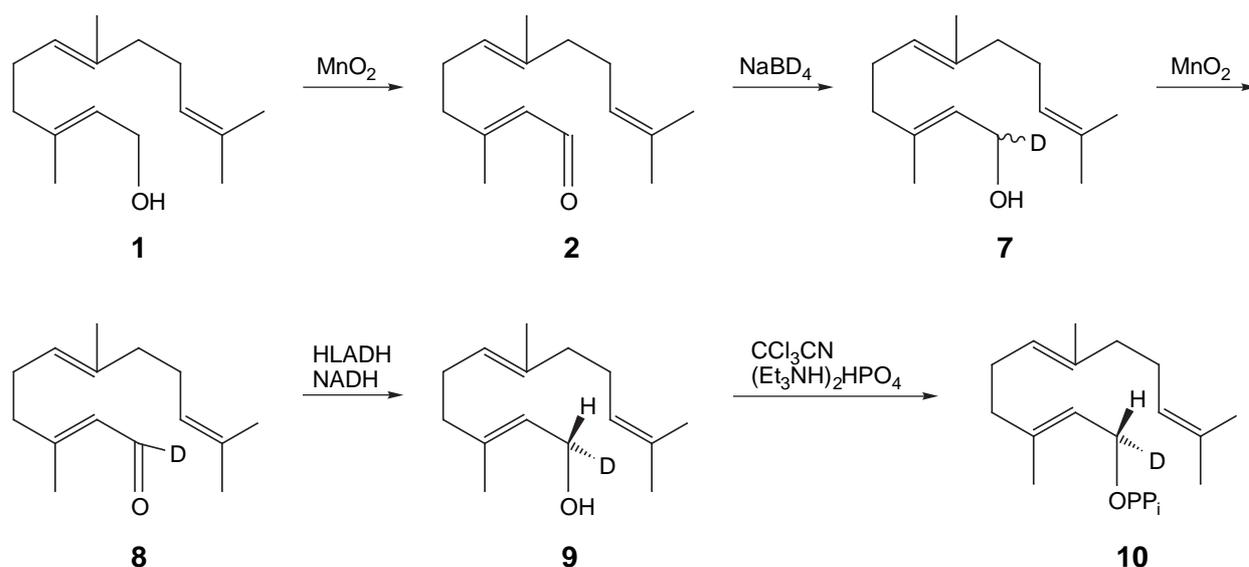
Es ist zu beachten, daß die Reaktion ein racemisches Produktgemisch liefert. Allerdings können beide Enantiomere von HLADH verwendet werden\*. Daher kann [1-<sup>2</sup>H]-Cyclohexenol in der in Abb. 73 dargestellten Reaktionsfolge in äquimolaren Verhältnissen eingesetzt werden.

\* Zwar besitzt HLADH eine hohe Enantioselektivität gegenüber Aldehyden, bei Ketonen ist dies nicht immer der Fall. Gerade bei Ketonen wie [1-<sup>2</sup>H]-Cyclohexenol, bei denen es kaum Größenunterschiede der beiden Substituenten am Keton gibt, wird kaum eine Enantioselektivität von HLADH festgestellt.

Die Identifizierung aller Zwischenstufen und des Produktes erfolgte mittels Massenspektrometrie,  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie, sowie zusätzlich  $^{31}\text{P}$ -NMR-Spektroskopie<sup>[123]</sup> für (*IR*)-[1- $^2\text{H}$ ]-FDP. Die Bestimmung des Deuterierungsgrads deuterierter Verbindungen wurde mittels  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie vorgenommen<sup>[124]</sup>.

#### 4.5.2 Synthese von (*IS*)-[1- $^2\text{H}$ ]-FDP

Bereits *Cane*<sup>[9]</sup> demonstrierte die Synthese dieser Verbindung. Ausgangsverbindung der Synthese ist Farnesol **1** (Abb. 76).

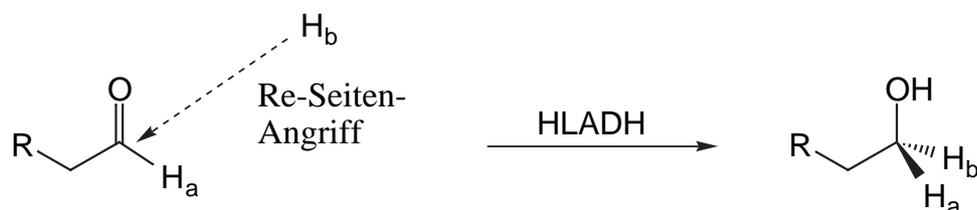


**Abb. 76** Synthesepfad für (*IS*)-[1- $^2\text{H}$ ]-FDP.

Im ersten Schritt der Synthese wird Farnesol mit dem Oxidationsmittel  $\text{MnO}_2$  zu Farnesal **2** oxidiert. Reduktion mit Natriumbordeuterid ergibt racemisches (*IRS*)-[1- $^2\text{H}$ ]-Farnesol **7**. Die deuterierte Verbindung wird einer erneuten Oxidation mit Mangandioxid unterzogen, um [1- $^2\text{H}$ ]-Farnesal **8** zu synthetisieren. Aufgrund eines primären kinetischen Isotopieeffektes<sup>[125]</sup> wird während der Reaktion fast ausschließlich das Proton an Position 1 von (*IRS*)-[1- $^2\text{H}$ ]-Farnesol abgespalten, während Deuterium im Molekül verbleibt. Das synthetisierte [1- $^2\text{H}$ ]-Farnesal besitzt daher einen Deuterierungsgrad von ca. 95%\*. Das deuterierte Farnesal **8** wird sodann durch enantioselective Katalyse mittels HLADH (Co-Faktor NADH) zu (*IS*)-[1- $^2\text{H}$ ]-Farnesol **9** reduziert. Reduktionsmittel ist der Co-Faktor des Enzyms, NADH. Interessant ist in diesem Zusammenhang ein Vergleich mit der Synthese von (*IR*)-[1- $^2\text{H}$ ]-Farnesol (Abb. 73). Bei jener Synthese war

\* Bei Oxidationen von Alkoholen mit Manganverbindungen ist die Lösung der C-H(D)-Bindung am geschwindigkeitsbestimmenden Schritt beteiligt. Quantenmechanische Berechnungen zeigen, daß das im Vergleich zu Wasserstoff schwerere Deuterium in einer C-D-Bindung langsamer schwingt als ein Wasserstoff in einer C-H-Bindung. Die C-D-Bindung wird daher um den Faktor 7 langsamer gelöst als eine C-H-Bindung.

ebenfalls HLADH Katalysator, allerdings war undeutertes Farnesal das Substrat und deuteriertes NADH („NADD“) das Reduktionsmittel. Bei der Synthese von (*1S*)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesol sind die Verhältnisse genau umgekehrt: deuteriertes Farnesal wird durch unmarkiertes NADH reduziert. Dieser Wechsel der Deuterium-Position ist notwendig in Anbetracht der Funktionsweise von HLADH (Abb. 77).



**Abb. 77** Stereochemischer Verlauf der durch HLADH katalysierten Reduktion von Aldehyden.

HLADH ist nur in der Lage ein Wasserstoffatom bzw. Deuteriumatom an der *Re*-Seite des Aldehyds einzuführen. Durch Steuerung der Deuterium-Position (im Farnesal oder in NADH) wird die Konfiguration im Zielmolekül bestimmt.

Letzter Schritt der Reaktionssequenz ist die bereits in Kapitel 4.5.1 detailliert beschriebene Veresterung des Alkohols mit Diphosphat, um das gewünschte Produkt (*1S*)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP **10** zu synthetisieren.

### 4.5.3 Synthese von [1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-FDP

Die Synthese benutzt als Ausgangsmaterial das kommerziell erhältliche (*E,E*)-Farnesol **1** (Abb. 78)<sup>[9]</sup>.

Der Synthesepfad ist bis zu der Synthese von [1-<sup>2</sup>H]-Farnesal **8** identisch mit dem Plan für die (*1S*)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP Synthese. Um [1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-FDP zu synthetisieren, wird nun allerdings **8** einer erneuten Reduktion mit Natriumbor-deuterid unterzogen, um [1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Farnesol **11** zu erzeugen. Letzter Schritt ist die Veresterung von **11** mit Diphosphat (siehe Kapitel 4.5.1) um [1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-FDP **12** zu synthetisieren.

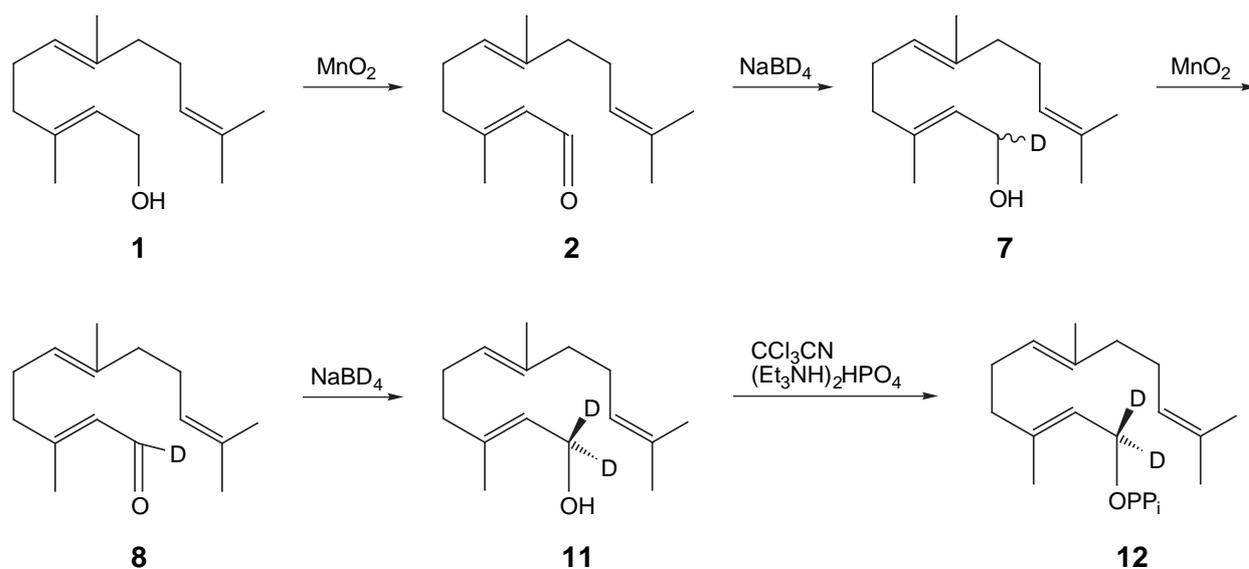


Abb. 78 Synthesepfad für [1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-FDP.

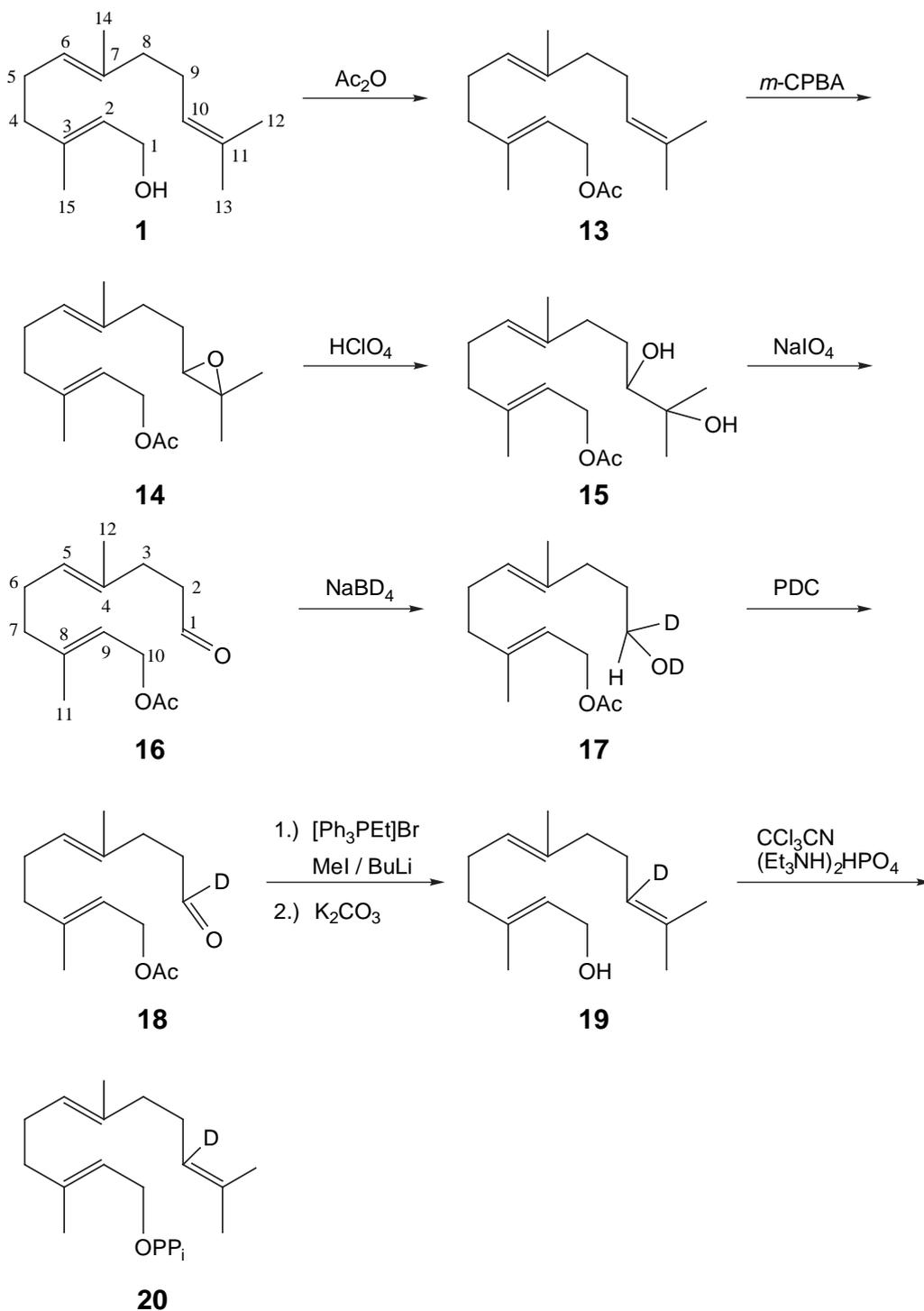
#### 4.5.4 Synthese von [10-<sup>2</sup>H]-FDP

Die achtstufige Synthese<sup>[9,126]</sup> beginnt mit der Umsetzung von kommerziell erhältlichem (*E,E*)-Farnesol **1** mit Acetanhydrid. Das resultierende Farnesylacetat **13** trägt eine Acetylenschutzgruppe, um die Alkoholfunktion des Farnesols im weiteren Syntheseverlauf vor Oxidationen zu schützen (Abb. 79).

Farnesylacetat wird mit *meta*-Chlorperbenzoesäure oxidiert. Das Peroxid oxidiert selektiv Doppelbindungen zu Epoxiden. Es entsteht eine Mischung aus 6,7:10,11-Diepoxyfarnesylacetat (ca. 10%), 6,7-Epoxyfarnesylacetat (ca. 30%) und dem gewünschten Produkt 10,11-Epoxyfarnesylacetat **14** (ca. 60%). Eine Aufreinigung der Mischfraktion ist zu diesem Zeitpunkt der Synthese nur schwer möglich, andererseits ist eine solche Aufreinigung auch nicht erforderlich. Bereits im nächsten Schritt wird 10,11-Epoxyfarnesylacetat (inkl. seiner Nebenprodukte) mit wässriger Perchlorsäure umgesetzt, um die Epoxidfunktion zu einem Diol zu oxidieren. Neben dem gesuchten 10,11-Dihydroxyfarnesylacetat **15** entstehen zusätzlich die Diole der Nebenprodukte (6,7-Dihydroxyfarnesylacetat und 6,7,10,11-Tetrahydroxyfarnesylacetat). An dieser Stelle der Synthesesequenz ist eine Isolierung der verschiedenen Diole leicht durch Flash-Kieselgel-Chromatographie erreichbar.

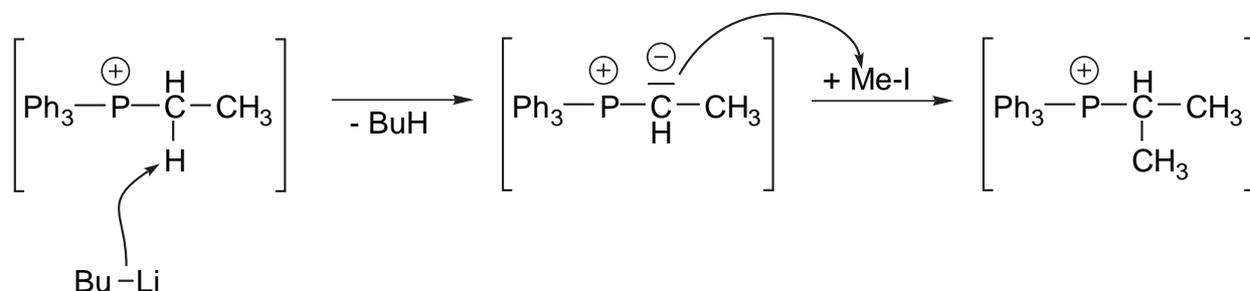
Das reine 10,11-Dihydroxyfarnesylacetat wird mit wässrigem Periodat umgesetzt, um eine Diol-Spaltung unter Bildung eines Aldehyds zu erreichen. Die Reaktion ist bekannt aus der klassischen Zuckerchemie, wo sie Anwendung bei dem schrittweisen Abbau von Kohlenhydraten fand<sup>[127]</sup>. Produkt ist Farnesylacetatrinoraldehyd **16**. Die Aldehydfunktion von **16** wird mit Hilfe von Natriumbordeuterid zu einem deuterierten Alkohol reduziert. Es entsteht (*IRS*)-[1-<sup>2</sup>H]-10-Acetoxy-4,8-dimethyldeca-4,8-dien-1-ol **17**. Dieser

Alkohol wird zu [10-<sup>2</sup>H]-Farnesylacetatrinoraldehyd **18** oxidiert. Oxidationsmittel ist PDC (im Vergleich zu den in Kapitel 4.5.1 - 4.5.4 beschriebenen Synthesen lieferte PDC in diesem Fall eine höhere Ausbeute als MnO<sub>2</sub>). Bei diesem Schritt wird die Bedeutung der Acetylschutzgruppe deutlich. Ohne sie wären zwei Alkoholfunktionen im Molekül vorhanden gewesen.



**Abb. 79** Synthesepfad für [10-<sup>2</sup>H]-FDP (**16** – **18** besitzen eine andere Nummerierung).

In einer Wittig-Reaktion wird der Aldehyd **18** mit einer C-3-Gruppe verknüpft. Für diese Reaktion wird zunächst die C-3-Gruppe erzeugt. Dafür wird Ethyltriphenylphosphoniumbromid unter Einfluß von Butyllithium mit einer Methylgruppe verknüpft (Abb. 80).



**Abb. 80** Darstellung von Isopropyltriphenylphosphoniumbromid.

Das gebildete Isopropyltriphenylphosphoniumbromid wird ohne Aufarbeitung erneut mit Butyllithium umgesetzt und das entstandene Ylid mit [10-<sup>2</sup>H]-Farnesylacetat-trinoraldehyd versetzt ([10-<sup>2</sup>H]-Farnesylacetat-trinoraldehyd darf erst nach der Synthese der C-3-Einheit zugefügt werden, da ansonsten auch die Möglichkeit der Reaktion des Aldehyds mit einer C-2-Einheit besteht). Diese Wittig-Reaktion liefert [10-<sup>2</sup>H]-Farnesylacetat, das während der Aufarbeitung des Reaktionsansatzes mit Kaliumcarbonat umgesetzt wird. Im Basischen wird die Acetylschutzgruppe abgespalten und es entsteht [10-<sup>2</sup>H]-Farnesol **19**. Neben dem gesuchten (*E,E*)- [10-<sup>2</sup>H]-Farnesol entsteht unter den relativ harten Reaktionsbedingungen auch das (*2E,6Z*)-Isomer. Beide Isomere werden voneinander mittels Flash-Chromatographie an Silbernitrat-imprägniertem Kieselgel getrennt<sup>[27]</sup>.

Letzter Schritt der Reaktion ist die Veresterung von **19** mit Diphosphat (siehe Kapitel 4.5.1) und liefert (*E,E*)- [10-<sup>2</sup>H]-FDP.

## 4.6 Aufklärung der Cyclisierungsmechanismen

Da nun sowohl die isolierten Sesquiterpen-Synthasen, als auch geeignet markierte Substrate vorlagen, konnte die Aufklärung der Cyclisierungsmechanismen durchgeführt werden.

Wie in Kapitel 3.2.3 (Seite 21) ausführlich beschrieben, werden Synthasen mit markierten Substratanalogen inkubiert, um dann die Position der Markierungen in den syn-

thetisierten Molekülen zu ermitteln. Es gibt drei Ansätze, um die Position eines Deuterium- oder Tritium-Atoms in einem Molekül zu bestimmen:

- Schrittweiser Abbau des Produktes zu definierten Segmenten, die auf Radioaktivität getestet werden, um so das Segment zu ermitteln, in dem sich die Markierung befindet (nur bei Tritium-Markierungen möglich).
- Analyse des Produktes mittels NMR-Spektroskopie (nur für Deuterium-Markierungen).
- Analyse des Produktes mittels Massenspektrometrie.

Abbaureaktionen von radioaktiv markierten Proben sind heute nicht mehr Stand der Technik, da die alternativen Methoden ungefährlicher und präziser sind. Somit blieben Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie als mögliche Analysenmethoden.

Die NMR-Spektroskopie kann auf zwei möglichen Wegen durchgeführt werden:

- $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie des deuterierten Produktes, um zu detektieren, welche Signale gegenüber dem Spektrum der unmarkierten Verbindung nicht mehr auftreten. Protonen, die diesen Signalen zugeordnet sind, müssen somit durch Deuterium ausgetauscht sein<sup>[128]</sup>.
- $^2\text{H}$ -NMR-Spektroskopie des Produktes; die Verschiebung der detektierten Signale wird mit dem  $^1\text{H}$ -NMR-Spektrum der unmarkierten Verbindung verglichen, um eine Signalzuordnung vornehmen zu können. Möglich ist dies durch die Tatsache, daß Signalverschiebungen im  $^2\text{H}$ -NMR und  $^1\text{H}$ -NMR nahezu identisch sind<sup>[129]</sup>.

Tab. 10 gibt eine Übersicht über die Vor- und Nachteile beider NMR-Methoden. Bei der Analyse von Sesquiterpen-Synthesen aus höheren Pflanzen stellt sich stets das Problem, daß nur eine geringe Enzymaktivität vorhanden ist, die im Verlaufe der Enzymreinigung zusätzlich stetig absinkt. Da für die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie reine Verbindungen benötigt werden, müßte im Falle von *S. canadensis* ein aufgereinigter Enzymextrakt verwendet werden, in dem nur (+)- oder (-)-Germacren-D-Synthase-Aktivität vorliegt. Da die Synthesen erst nach drei Reinigungsschritten in solch reiner Form vorliegen, war an diesem Punkt die Aktivität nicht mehr groß genug, um eine  $^1\text{H}$ -NMR-Probe zu erstellen. Die  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie war somit für die Strukturaufklärung der deuterierten Sesquiterpene nicht durchführbar.

Die  $^2\text{H}$ -NMR-Spektroskopie<sup>[130]</sup> ermöglicht es, den Enzymrohextrakt für Inkubationen zu verwenden, da endogen synthetisierte Sesquiterpene die Analyse nicht stören. Allerdings muß Pflanzenmaterial gefunden werden, daß ausschließlich ein Sesquiterpen synthetisiert, da sich ansonsten mehrere Signale von verschiedenen Verbindungen überlagern. Ein solches Pflanzenmaterial ist für *S. canadensis* nur äußerst schwer zu finden, da

die Besonderheit der Pflanze in der Vielfalt der von ihr produzierten Sesquiterpene liegt. Dennoch wurde im Verlaufe dieser Dissertation auch Pflanzenmaterial analysiert, das zu 90% (-)-Germacren D produzierte. Allerdings war dies darauf zurückzuführen, daß es sich um relativ altes Pflanzenmaterial handelte, bei dem der Großteil der Sesquiterpen-Synthasen bereits denaturiert war\*. Entsprechend gering war in diesem Material auch die (-)-Germacren-D-Synthase-Aktivität. Versuche, den Rohextrakt dieses Materials mit deuterierten FDP zu inkubieren gelangen zwar, allerdings war die produzierte Menge (-)-Germacren D so gering, daß auch eine 72-stündige  $^2\text{H}$ -NMR-Messung keine Signale zeigte (auf dieses Experiment wird daher nicht näher im Experimentellen Teil eingegangen). Somit war auch die  $^2\text{H}$ -NMR-Spektroskopie für die Mechanismus-Aufklärung ungeeignet†.

	Vorteile	Nachteile
$^1\text{H}$ -NMR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hohe Empfindlichkeit, Probenmengen &lt; 50 nmol genügen für eine Analyse.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Die Probe muß in sehr reiner Form vorliegen, endogen produzierte Sesquiterpene müssen vor der Analyse entfernt werden.</li> <li>• Die Probe muß sich in einem deuterierten Lösungsmittel befinden.</li> </ul>
$^2\text{H}$ -NMR	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Probe kann mit endogenen Sesquiterpenen verunreinigt sein, da diese keine Signale liefern.</li> <li>• Probe kann in einem beliebigen Lösungsmittel vorliegen.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Geringe Empfindlichkeit, die Probenmenge muß mindestens 100 nmol betragen.</li> <li>• Bei Probenmengen &lt; 200 nmol werden hohe Anforderungen an die NMR-Geräte gestellt, da tagelange Meßzeiten nötig sind.</li> </ul>

**Tab. 10** Vor- und Nachteile der  $^1\text{H}$ - und  $^2\text{H}$ -NMR-Spektroskopie.

\* Es hat sich herausgestellt, daß Pflanzenmaterial, das im Wachstum geerntet wird (möglichst noch vor Ausbildung der Blüte), die höchste Synthase-Aktivität besitzt. Später geerntete „ältere“ Pflanzen zeigen kaum noch Synthase-Aktivität. Über die Ursache für dieses Phänomen kann nur spekuliert werden. Möglicherweise werden Sesquiterpene nur in der Wachstumsphase von der Pflanze benötigt. Später wird dann die Produktion ihrer Synthasen von der Pflanze eingestellt.

† Weder die  $^1\text{H}$ - noch die  $^2\text{H}$ -NMR-Spektroskopie fanden bisher eine Anwendung in der Mechanismus-Aufklärung von Sesquiterpen-Synthasen aus höheren Pflanzen. Diese Techniken wurden entweder für Synthasen aus Bakterien- oder aus Pilzkulturen verwendet, da in solchen schnellwachsenden Systemen eine wesentlich höhere Synthasenkonzentration vorliegt.

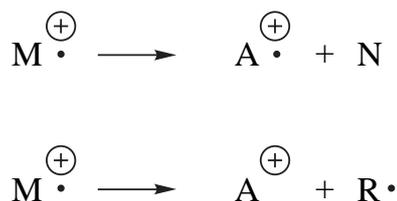
Daher fiel die Wahl auf die Massenspektrometrie als Methode für die Strukturaufklärung deuterierter Sesquiterpene. Um störende endogen produzierte Sesquiterpene aus den Extrakten zu entfernen, wurde für Inkubationen mit deuteriertem FDP die DEAE-Fraktion verwendet. Von der DEAE-Fraktion wurden (-)- $\alpha$ -Gurjunen, (+)- $\gamma$ -Gurjunen, (+)- und (-)-Germacren D synthetisiert. Die Analyse erfolgte daher mittels GC-MS unter Verwendung einer chiralen stationären GC-Phase (6T-2,3-Me- $\beta$ -CD). Da die GC-MS-Technik als hinlänglich bekannt gilt, wird nur auf ihre Ergebnisse in den folgenden Kapiteln eingegangen.

Zusätzlich zur GC-MS-Analyse wurden auch „Linked-Scan-MS“-Messungen für deuteriertes (+)- und (-)-Germacren D durchgeführt. Diese Messungen dienten zur Aufklärung von Zerfallsmustern der entsprechenden Massenspektren. Da die „Linked-Scan-Technik“ nicht allzu verbreitet ist, wird in Kapitel 4.6.1 eine kurze Einführung in diese Technik gegeben.

Die Kapitel 4.6.2 bis 4.6.4 beschäftigen sich mit der Mechanismen-Aufklärung der (-)- $\alpha$ -Gurjunen, (+)- und (-)-Germacren-D-Synthese.

#### 4.6.1 Linked Scan-Massenspektrometrie

Bei der Linked Scan Massenspektrometrie<sup>[131]</sup> werden metastabile Ionen<sup>[132]</sup> im Massenspektrometer detektiert. Bei einer normalen Reaktion in der Ionenquelle des MS erfolgen folgende Reaktionen (vereinfacht dargestellt, Abb. 81):



**Abb. 81** Schematische Zerfallsreaktion im MS.

Das Mutterion  $\text{M}^{\oplus}$  zerfällt in der Ionenquelle zum Tochterion  $\text{A}^{\oplus}$  unter Abspaltung eines neutralen Teils N. Beide Ionen können – bei ausreichender kinetischer Energie – später im Detektor des MS detektiert werden. Metastabile Ionen sind Molekül- oder Fragmentionen, die nicht in der Ionenquelle, sondern erst auf dem Weg von der Quelle zum Detektor zerfallen.

Die Technik der Linked Scan-Massenspektrometrie wird mit einem doppelfokussierenden Sektorfeld-Massenspektrometer durchgeführt. Der elektrostatische Sektor für die Energiefokussierung (*E*-Sektor) befindet sich vor dem Magnetsektor (*B*-Sektor), es wird von einer EB-Geometrie des Gerätes gesprochen. Zwischen der Ionenquelle und dem

*E*-Sektor befindet sich die „erste feldfreie Zone“, in der metastabile Ionen zerfallen können. Weitere feldfreie Zonen befinden sich zwischen *E*-Sektor und *B*-Sektor (zweite feldfreie Zone) bzw. zwischen *B*-Sektor und Detektor (dritte feldfreie Zone). Bei der Linked Scan-Methode werden metastabile Ionen der ersten feldfreien Zone detektiert.

In dem System gibt es drei Variablen: Beschleunigungsspannung *V* (variiert zwischen 2 – 10 kV), *E*-Sektor-Spannung und Feldstärke des *B*-Sektors. Das Prinzip einer Linked Scan-Messung beruht darauf, eine der Variablen konstant zu halten und die beiden anderen Variablen während der Messung so zu verändern, daß ihr Verhältnis zueinander ebenfalls konstant bleibt. Dieses Prinzip ermöglicht es, metastabile Ionen im Detektor nachzuweisen.

Die besten Resultate werden erzielt, wenn die Beschleunigungsspannung *V* konstant gehalten wird. Demzufolge muß das Verhältnis von *E* und *B* ebenfalls konstant gehalten werden. Es werden drei Arten von Linked Scan-Messungen unterschieden (Tab. 11):

Scan Art	Detektion
$B / E = \text{const}$	Tochterionen
$B^2 / E = \text{const}$	Elternionen
$(B / E) \cdot (1-E)^{1/2} = \text{const}$	„constant loss“

**Tab. 11** Verschiedene Arten von Linked Scan-Messungen.

Die Linked Scan-MS-Technik ermöglicht es somit, von bestimmten Ionen  $M^+$  selektiv deren Tochterionen zu detektieren (Tochterionen-Scans)<sup>[133]</sup>, bzw. von Ionen  $A^+$  deren Elternionen zu bestimmen (Elternionen-Scans). Eine Besonderheit sind die „constant loss“-Messungen<sup>[134]</sup>, sie detektieren sämtliche Ionen, die ein neutrales Teilchen bestimmter Masse abspalten.

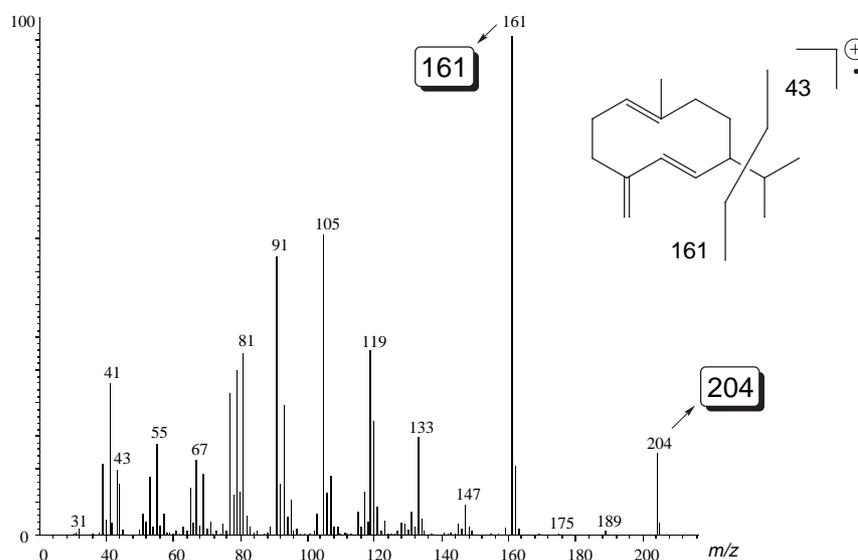
Praktische Anwendung findet diese Methode bei der Analyse von Zerfallsmustern im MS. So kann z.B. bei Sesquiterpenen bestimmt werden, welche Ionen direkt aus dem Molekülion  $M^+$  ( $m/z = 204$ ) entstehen. Gewöhnlich wird dies durch Messung der Tochterionen von  $m/z = 204$  erzielt.

Linked Scan-Messungen sind in der Lage dieselben Ergebnisse zu liefern wie die Tandem-Massenspektrometrie (MS-MS-Technik).

#### 4.6.2 Cyclisierungsmechanismus von (-)-Germacren-D-Synthase

Eine DEAE-aufgereinigte Enzymfraktion wurde mit (*1R*)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP, (*1S*)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP und [10-<sup>2</sup>H]-FDP inkubiert. Die Assays wurden analog den Radio-Macroassays (siehe Kapitel 4.3.1, Seite 39) durchgeführt. Die Assay-Extrakte wurden mittels GC-MS analysiert (GC-Phase: 6T-2,3-Me-β-CD). Um einen Vergleich der Mas-

senspektren zu ermöglichen, zeigt Abb. 82 zunächst das Massenspektrum von unmarkiertem Germacren D.



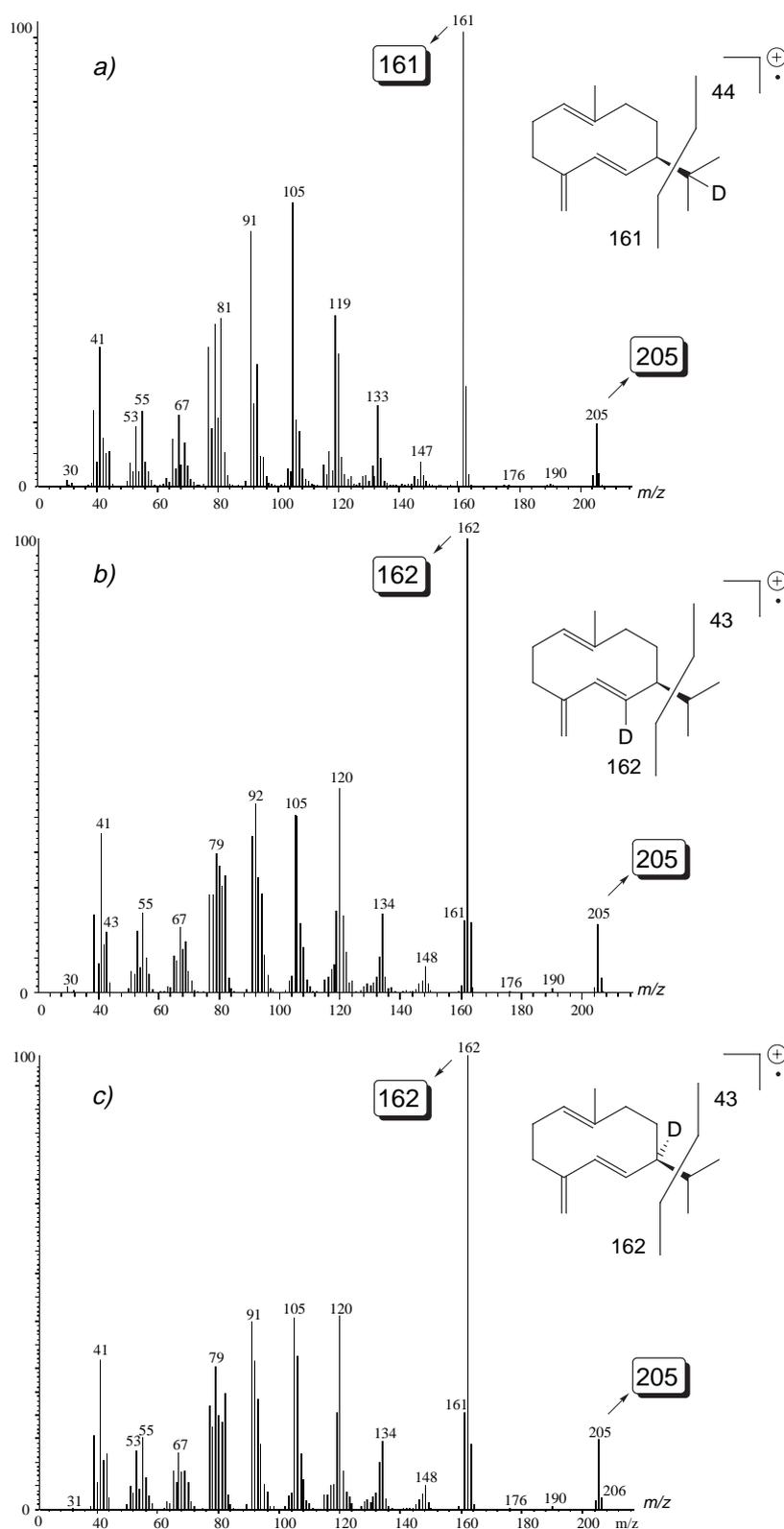
**Abb. 82** Massenspektrum von unmarkiertem Germacren D (EI, 70 eV).

Das Spektrum zeigt den Molekülpeak erwartungsgemäß bei  $m/z = 204$ . Der Basispeak wird bei  $m/z = 161$  detektiert, dies entspricht einer Abspaltung von 43 amu und somit einer Abstraktion der Isopropylgruppe des Moleküls.

Abb. 83 zeigt die Massenspektren von deuteriertem Germacren D, das aus Inkubationen mit den verschiedenen deuterierten Substraten hervorgeht.

Bei Inkubationen von (-)-Germacren-D-Synthase mit (*IR*)-[1- $^2\text{H}$ ]-FDP wurde deuteriertes (-)-Germacren D synthetisiert (Abb. 83a). Die Tatsache, daß der Molekülpeak bei  $m/z = 205$  detektiert wird, beweist die Präsenz eines Deuterium-Atoms im Molekül ( $m/z = 205$  entspricht der Masse von  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}^2\text{H}$ ). Somit bliebe zu klären, an welcher Molekülposition sich das Deuterium befindet. Da der Basispeak bei  $m/z = 161$  detektiert wird (wie auch in unmarkierten Germacren D), muß eine Isopropylgruppe der Masse  $m/z = 44$  abgespalten werden. Dies ist nur möglich, wenn sich das Deuteriumatom in der Isopropylgruppe befindet.

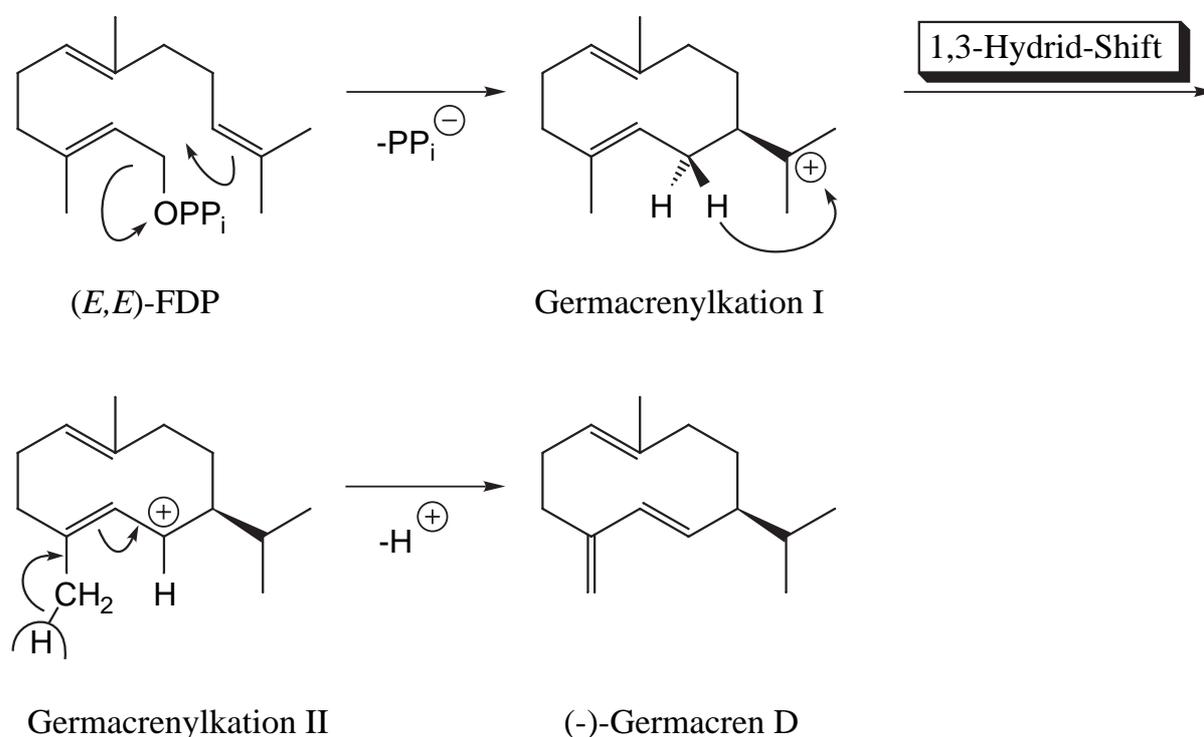
Entsprechende Inkubationen der Synthase mit (*IS*)-[1- $^2\text{H}$ ]-FDP lieferten erneut deuteriertes (-)-Germacren D (Abb. 83b), wie durch den Molekülpeak bei  $m/z = 205$  ( $\text{C}_{15}\text{H}_{23}^2\text{H}$ ) bewiesen wird. Der Basispeak wird jetzt bei  $m/z = 162$  detektiert. Somit werden 43 amu abgespalten, dies entspricht der Abstraktion einer unmarkierten Isopropylgruppe. Das Deuteriumatom muß sich daher im Ringsystem des Moleküls befinden.



**Abb. 83** Massenspektren (EI, 70 eV) von (-)-Germacren D als Inkubationsprodukt von (*IR*)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP (a); (*IS*)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP (b) und [10-<sup>2</sup>H]-FDP (c).

Inkubationen der Synthese mit  $[10\text{-}^2\text{H}]\text{-FDP}$  lieferten deuteriertes (-)-Germacren D (Abb. 83c) mit einem Molekülpeak bei  $m/z = 205$  ( $\text{C}_{15}\text{H}_{23}^2\text{H}$ ). Der Basispeak liegt erneut bei  $m/z = 162$ , d.h. eine unmarkierte Isopropylgruppe wird vom Molekül abgespalten. Das Deuteriumatom befindet sich im Ringsystem von Germacren D. Ein Vergleich der Massenspektren von Abb. 83b und c zeigt, daß beide Spektren charakteristische Signale bei  $m/z = 205$  und  $m/z = 162$  besitzen. Andererseits unterscheiden sich ihre Signalintensitäten im unteren Massenbereich. Dies ist ein Indiz dafür, daß sich das Deuterium zwar in beiden Fällen im Ringsystem, jedoch jeweils in unterschiedlichen Positionen befindet.

Die Ergebnisse lassen sich mit einem Cyclisierungsmechanismus, der über einen 1,3-Hydrid-Shift verläuft in Einklang bringen (Abb. 84).



**Abb. 84** Cyclisierungsmechanismus der (-)-Germacren D Synthese.

Im ersten Schritt wird unter Abspaltung der Diphosphat-Gruppe aus FDP das Germacrenylkation I gebildet. Diese Reaktion entspricht formal einer  $\text{S}_{\text{N}}2$ -Reaktion mit Inversion am Reaktionszentrum (die konsequente Anwendung der Stereochemie-Nomenklatur führt dazu, daß trotz Inversion am Reaktionszentrum aus pro- $R\text{-H-1}$  des FDP wieder pro- $R\text{-H-1}$  des Germacrenylkation I wird<sup>[135]</sup>). Die Inversion der Konfiguration an C-1 bei der Bildung des Germacrenylkations I wurde bereits von *Cane*<sup>[50]</sup> bei der

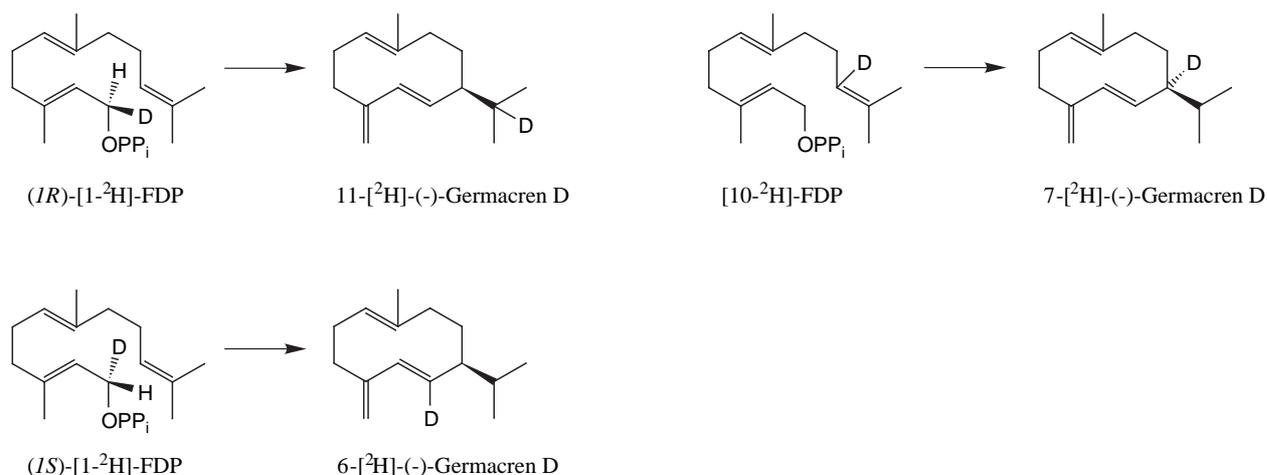
\* C-1 des FDPs hat als Substituenten höchste Priorität eine Diphosphat-Gruppe, zweithöchste Priorität besitzt die Kohlenstoffkette. Genau jene Kette besitzt aber nach der Reaktion zum Germacrenylkation I die höchste Priorität.

Aristolochen-Biosynthese nachgewiesen, da auch bei jener Biosynthese die Bildung des Germacrenylkations I der erste Cyclisierungsschritt ist (diese stereochemischen Überlegungen besitzen nur Gültigkeit bei FDP-Molekülen mit einem Deuteriumsubstituenten in Position 1).

Für einen 1,3-Hydrid-Shift kommen mehrere Wasserstoffatome in Frage. Die Inkubationen mit (*IR*)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP zeigten jedoch, daß ausschließlich pro-*R*-H-1 von FDP in die Isopropylgruppe wandert. Inkubationen mit (*IS*)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP bewiesen einen Verbleib von pro-*S*-H-1 des FDP im Ringsystem. Somit wäre bewiesen, welches Wasserstoffatom in den Hydrid-Shift involviert ist. Gleichzeitig wird deutlich, daß sich während der Cyclisierung die Position von H-10 des FDP nicht ändert. Dies entspricht dem Ergebnis der Inkubationen mit [10-<sup>2</sup>H]-FDP.

Durch den 1,3-Hydrid-Shift wird das Germacrenylkation II erzeugt. Dies wird im letzten Schritt deprotoniert und Elektronenpaar-Verschiebungen führen zu (-)-Germacren D. Die Konfiguration an C-7 des (-)-Germacren D (das chirale Zentrum) wird bereits bei der initialen Cyclisierung festgelegt und später nicht mehr geändert.

Abb. 85 zeigt die Zuordnung der Inkubationsprodukte zu den jeweiligen deuterierten Substraten.



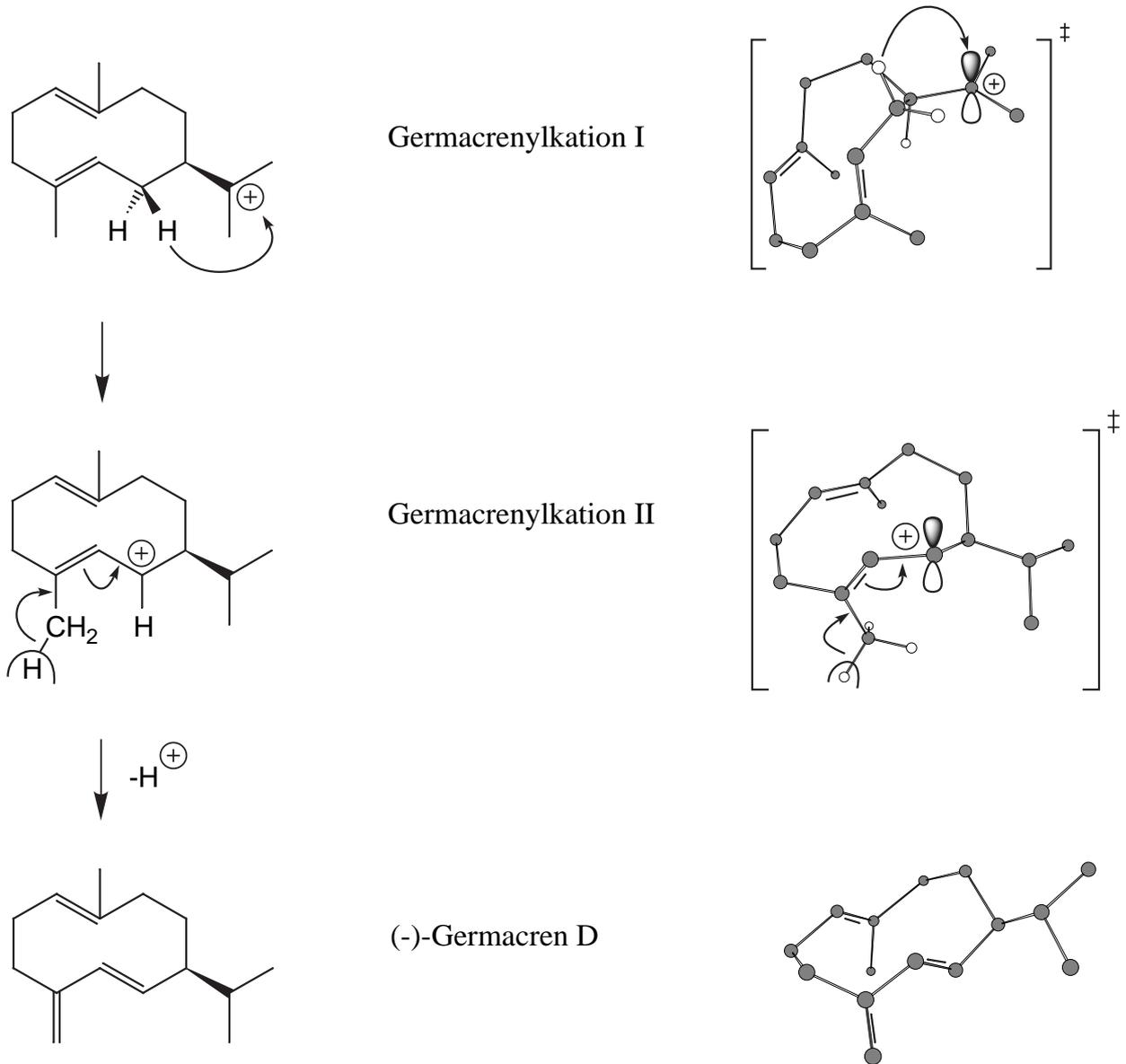
**Abb. 85** Inkubationsprodukte verschiedener deuterierter FDP-Substrate mit (-)-Germacren-D-Synthese.

Der Cyclisierungsmechanismus der (-)-Germacren-D-Synthese wurde zusätzlich mittels Molecular Modelling untersucht (Abb. 86)\*.

Das Molecular Modelling zeigt eindrucksvoll, daß sich im Germacrenylkation I nur pro-*R*-H-1 in der geeigneten *Anti*-Stellung zu den freien Molekülorbitalen der Isopropyl-

\* Die lokalen Energieminima der Übergangszustände bzw. Produkte wurden nach der MM2-Kraftfeldrechnung ermittelt. Es handelt sich dabei um gute Näherungen, dennoch dienen die Modelle nur der Veranschaulichung des dreidimensionalen Verlaufs der Cyclisierung.

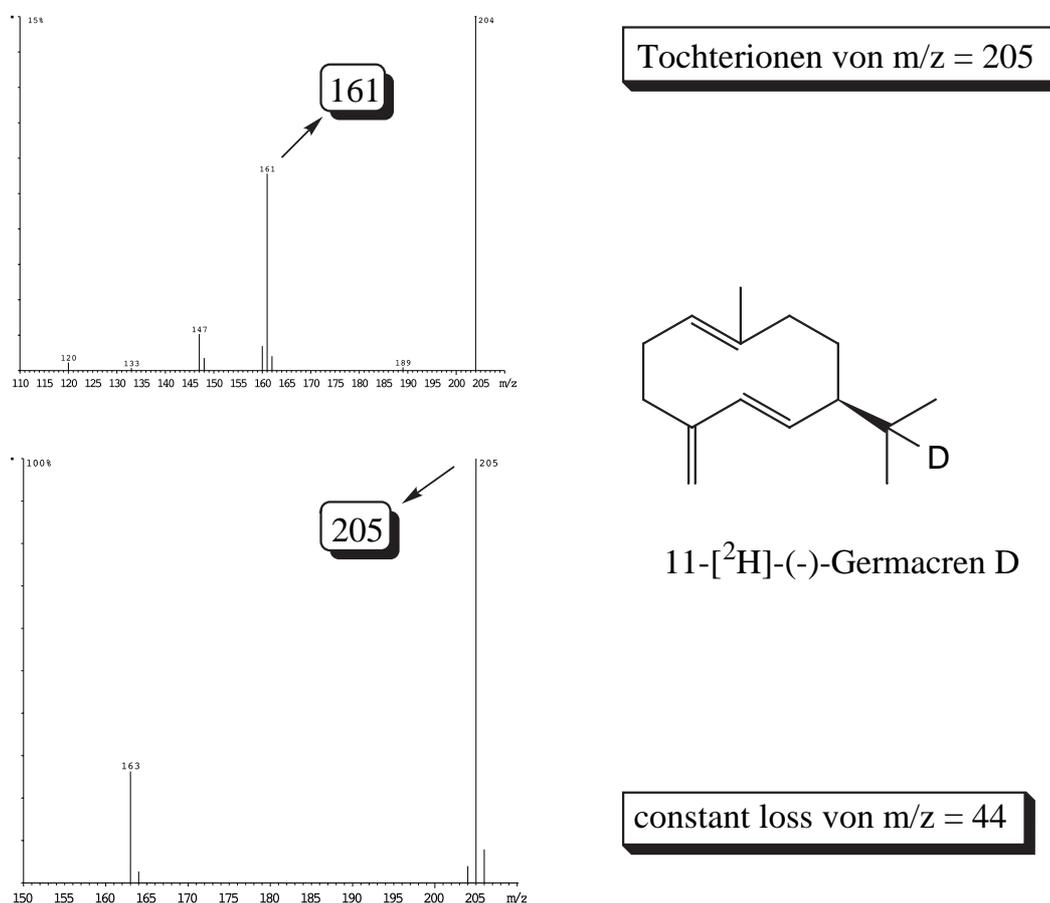
gruppe befindet (periplanare Anordnung). Pro-*S*-H-1 ist in *Gauche*-Stellung zu den Molekülorbitalen. Dies macht seine Verschiebung (auch unter enzymkatalysierten Bedingungen) äußerst schwierig. Demnach müßte pro-*R*-H-1 dem 1,3-Hydrid-Shift unterliegen. Dies entspricht dem Ergebnis der Inkubationsexperimente.



**Abb. 86** Molecular Modelling des (-)-Germacren-D-Synthase-Cyclisierungsmechanismus‘ (durchgeführt mit Chem3D Pro, Cambridge Soft). Die linke Seite der Abbildung zeigt den Reaktionsverlauf in herkömmlicher Zeichnungsweise, die rechte Seite zeigt die dreidimensionalen Modelle der Strukturen.

Von allen deuterierten Germacren D-Molekülen wurden Linked Scan-Messungen durchgeführt. Es sollte bewiesen werden, daß der Basispeak ( $m/z = 161$  bzw.  $m/z = 162$ ) tatsächlich durch direkten Zerfall des Molekülions entsteht. Daher wurden die Tochterio-

nen von  $m/z = 205$  gemessen und komplementär dazu eine constant loss-Messung für  $m/z = 44$  bzw.  $m/z = 43$  durchgeführt. Abb. 87 zeigt exemplarisch das Resultat einer constant loss-Messung (Abspaltung von  $m/z = 44$ ) und einer Tochterionen-Messung (Tochterionen von  $m/z = 205$ ) von 11- $^{[2}\text{H}]$ -(-)-Germacren D.



**Abb. 87** Linked Scan-Messungen von 11- $^{[2}\text{H}]$ -(-)-Germacren D.

Als Tochterionen von  $m/z = 205$  werden  $m/z = 204$  und  $m/z = 161$  detektiert. Die Abspaltung eines H-Radikals führt zu  $m/z = 204$ , das Auftreten des  $m/z = 161$  Signals beweist eindeutig, daß das dazugehörige Fragment direkt aus dem Molekülion gebildet wird. Die constant loss-Messung stützt dieses Ergebnis; sie zeigt, daß es nur zwei Ionen gibt, die ein neutrales Fragment mit der Masse 44 verlieren. Es handelt sich um die Ionen mit  $m/z = 205$  und  $m/z = 163$ . Das Auftreten des  $m/z = 205$  Signals ist der Beweis, daß das Molekülion eine Gruppe mit der Masse 44 abspaltet.

Da die Linked Scan-Massenspektren stets nur wenige Signale zeigen, werden die Ergebnisse dieser Messungen im folgenden tabellarisch dargestellt.

Tab. 12 zeigt die Resultate für die verschiedenen (-)-Germacren D-Moleküle.

Molekül	Tochterionen von $m/z = 205$	constant loss von 43 amu	constant loss von 44 amu
11- $[^2\text{H}]$ -(-)-Germacren D	161	-	205
6- $[^2\text{H}]$ -(-)-Germacren D	162	205	-
7- $[^2\text{H}]$ -(-)-Germacren D	162	205	-

**Tab. 12** Ergebnisse der Linked Scan Messungen für (-)-Germacren D.

Die Ergebnisse beweisen, daß Signale bei  $m/z = 161$  bzw.  $m/z = 162$  der Abspaltung einer deuterierten bzw. undeuterierten Isopropylgruppe aus den Molekülonen zugeordnet werden können.

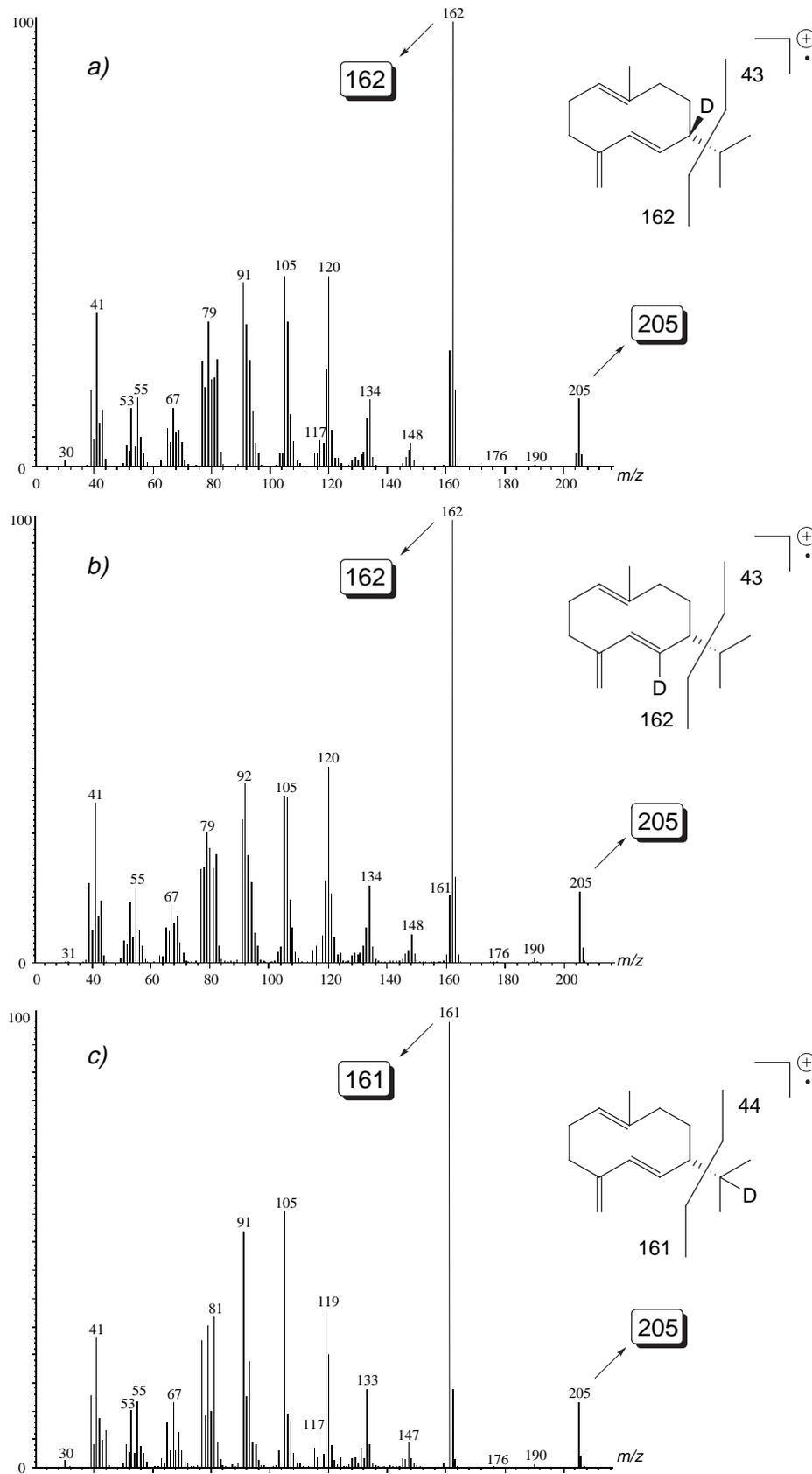
### 4.6.3 Cyclisierungsmechanismus von (+)-Germacren-D-Synthase

Die DEAE-aufgereinigte Enzym-Fraktion wurde mit (*1R*)- $[1\text{-}^2\text{H}]$ -FDP, (*1S*)- $[1\text{-}^2\text{H}]$ -FDP und  $[10\text{-}^2\text{H}]$ -FDP inkubiert. Inkubationsprodukte wurden massenspektrometrisch analysiert (siehe Kapitel 4.6.2). Abb. 88 zeigt die Massenspektren von deuteriertem (+)-Germacren D als Inkubationsprodukt der deuterierten Substrate.

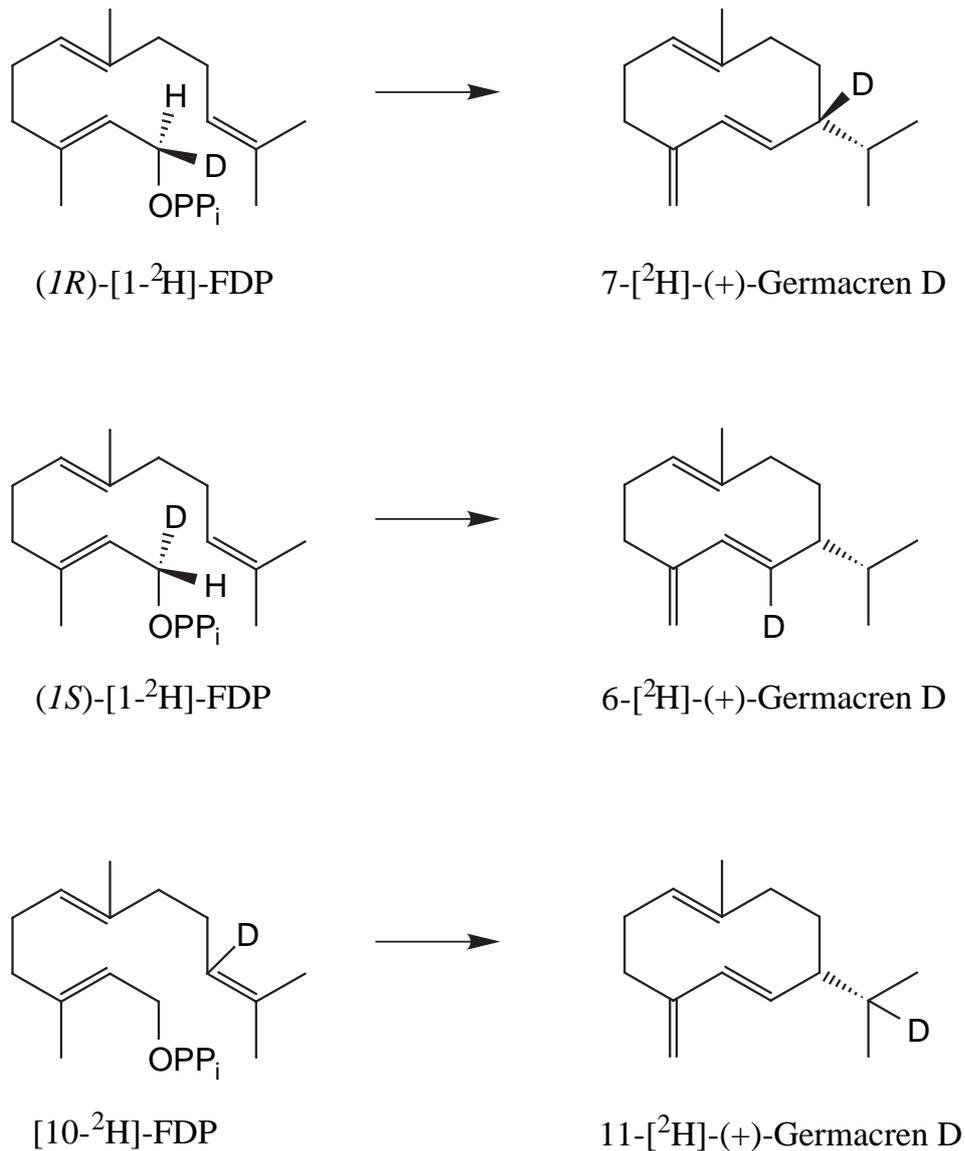
Eine Zuordnung der Spektren zu den verschiedenen (+)-Germacren D-Molekülen erfolgte durch Vergleich mit den entsprechenden (-)-Germacren D-Spektren (Abb. 83). Es wurde die Tatsache ausgenutzt, daß es sich um Spektren von Enantiomeren handelt, die identisch sind. Außerdem konnte der untere Massenbereich der Spektren für eine Zuordnung genutzt werden. Abb. 89 zeigt die Zuordnung der Inkubationsprodukte zu den Substraten.

Die Resultate lassen sich durch einen Cyclisierungsmechanismus erklären, bei dem (+)-Germacren D über einen doppelten 1,2-Hydrid-Shift gebildet wird (Abb. 90).

Im ersten Schritt wird FDP unter Abspaltung von Diphosphat zu einem Germacrenylkation cyclisiert; der einleitende Schritt ist somit identisch mit dem ersten Schritt der (-)-Germacren D-Biosynthese. Das gebildete Kation A verschiebt seine positive Ladung durch einen 1,2-Hydrid-Shift, es entsteht Kation B. C-7 von Kation B trägt nun die positive Ladung. Durch einen weiteren 1,2-Hydrid-Shift wird Kation C gebildet und die Konfiguration an C-7 festgelegt. Die Ergebnisse der Markierungsexperimente zeigen, daß im zweiten 1,2-Hydrid-Shift ausschließlich pro-*R*-H-1 verschoben wird. Im letzten Schritt wird ein Proton abgespalten und Elektronenpaare verschoben um (+)-Germacren D zu bilden.



**Abb. 88** Massenspektren (EI, 70 eV) von (+)-Germacren D als Inkubationsprodukt von (*IR*)-[1- $^2$ H]-FDP (a); (*IS*)-[1- $^2$ H]-FDP (b) und [10- $^2$ H]-FDP (c).

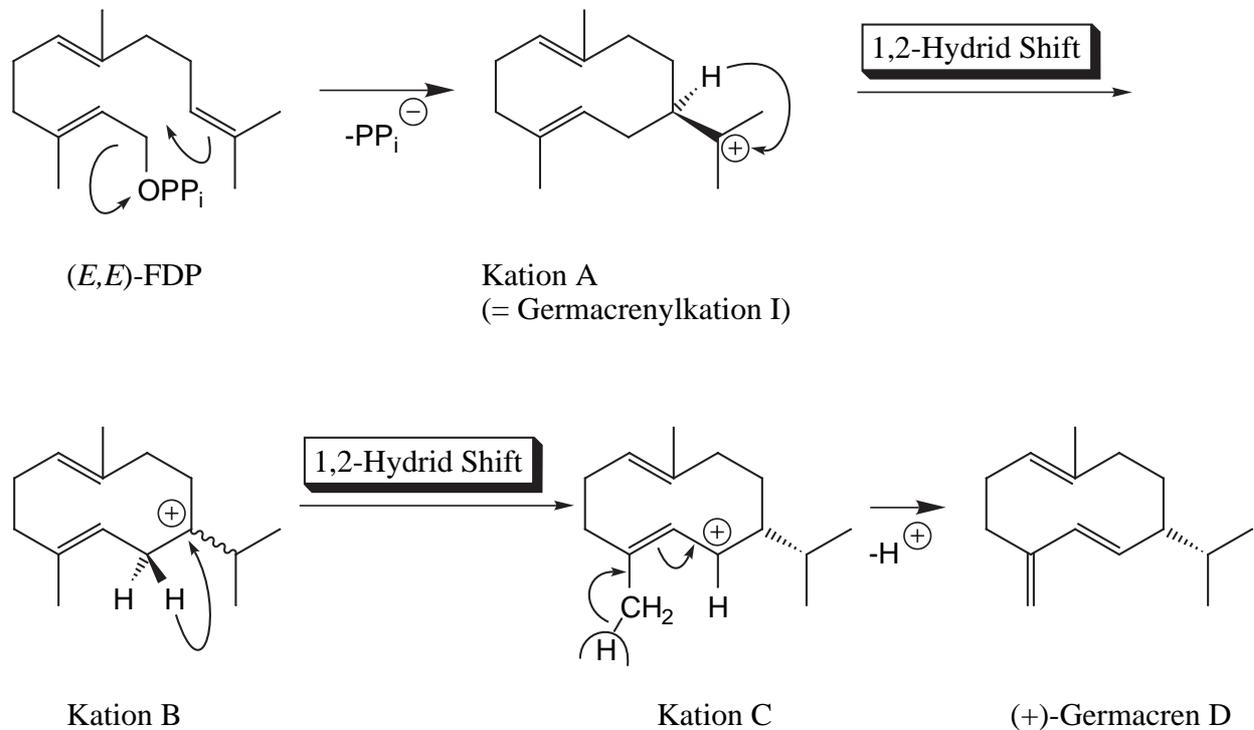


**Abb. 89** Inkubationsprodukte verschiedener deuterierter FDP-Substrate mit (+)-Germacren-D-Synthase.

Molecular Modelling-Studien zeigten, daß der doppelte 1,2-Hydrid-Shift unter Konformations Aspekten problemlos möglich ist (Abb. 91).

Molecular Modelling beweist, daß sich im Kation A zwei Wasserstoffatome in der erforderlichen *Anti*-Stellung zu den freien Molekülorbitalen der Isopropylgruppe befinden. Zum einen pro-*R*-H-1 und zum anderen das Wasserstoffatom an C-7. Die Migration von pro-*R*-H-1 würde zu einem 1,3-Shift und somit zur Bildung von (-)-Germacren D führen. Dieser Fall liegt bei der (-)-Germacren-D-Synthase vor (siehe Kapitel 4.6.2). Die (+)-Germacren-D-Synthase katalysiert hingegen einen 1,2-Hydrid-Shift, der ein Wasserstoffatom von C-7 zu C-11 verschiebt. An dieser Stelle wird die Bedeutung der enzymatischen Katalyse besonders deutlich: im Germacrenylkation ist sowohl ein 1,2- als auch ein

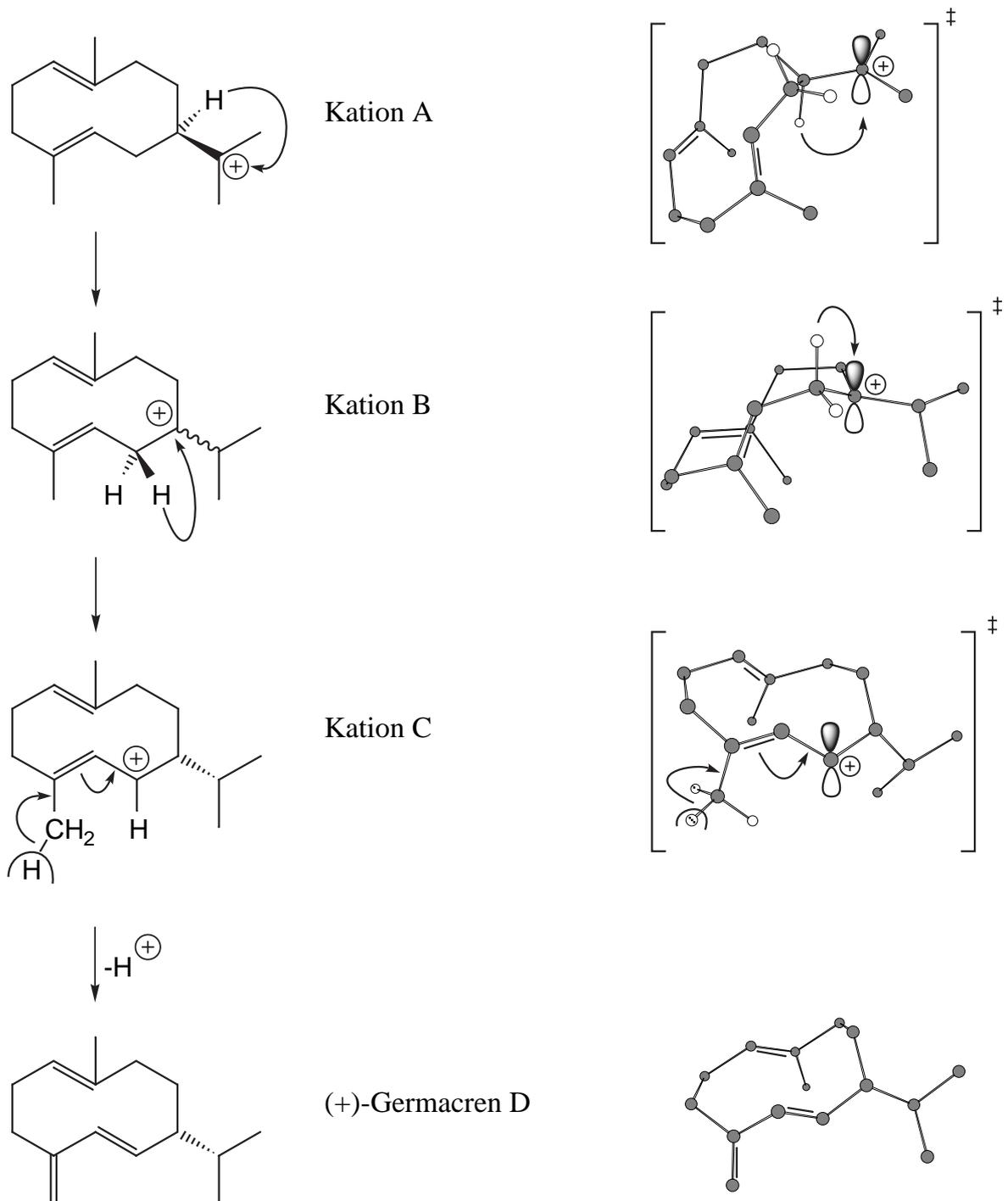
1,3-Hydrid-Shift stereochemisch möglich. Unter enzymfreien Bedingungen würde also die Bildung eines Racemats erwartet werden. In Anwesenheit der Enzyme wird jedoch jeweils enantioselektiv nur eines der möglichen Produkte gebildet.



**Abb. 90** Cyclisierungsmechanismus der (+)-Germacren-D-Synthase.

Das dreidimensionale Modell von Kation B verdeutlicht, daß nur pro-*R*-H-1 in der erforderlichen *Anti*-Stellung zu den freien Molekülorbitalen ist. Die Konsequenz ist ein zweiter 1,2-Hydrid-Shift. Ebenfalls zeigt sich, daß das Hydrid C-7 nur von der *Re*-Seite angreifen kann. Dieser Angriff legt die Konfiguration an C-7 fest. Es wurde eindeutig bewiesen, daß durch einen doppelten 1,2-Hydrid-Shift ausschließlich (+)-Germacren D synthetisiert werden kann.

Fazit: Nach einer initialen Cyclisierung von FDP zu einem Germacrenylkation sind sowohl ein doppelter 1,2-Hydrid-Shift als auch ein einfacher 1,3-Hydrid-Shift stereochemisch möglich. Ersterer führt zu (+)-Germacren D, letzterer führt zu (-)-Germacren D. Welcher Weg eingeschlagen wird, wird ausschließlich durch das katalysierende Enzym bestimmt.



**Abb. 91** Molecular Modelling des (+)-Germacren-D-Synthese-Cyclisierungsmechanismus‘ (durchgeführt mit Chem3D Pro, Cambridge Soft). Die linke Seite der Abbildung zeigt den Reaktionsverlauf in herkömmlicher Zeichnungsweise, die rechte Seite zeigt die dreidimensionalen Modelle der Strukturen.

Von den deuterierten (+)-Germacren D Molekülen wurden auch Linked Scan-Messungen durchgeführt (Tab. 13).

Molekül	Tochterionen von $m/z = 205$	constant loss von 43 amu	constant loss von 44 amu
11- $^{2}\text{H}$ -(+)-Germacren D	161	-	205
6- $^{2}\text{H}$ -(+)-Germacren D	162	205	-
7- $^{2}\text{H}$ -(+)-Germacren D	162	205	-

**Tab. 13** Ergebnisse der Linked Scan-Messungen für (+)-Germacren D.

Die Ergebnisse beweisen, daß die Signale von  $m/z = 161$  bzw.  $m/z = 162$  aus der Abspaltung einer deuterierten bzw. undeuterierten Isopropylgruppe resultieren.

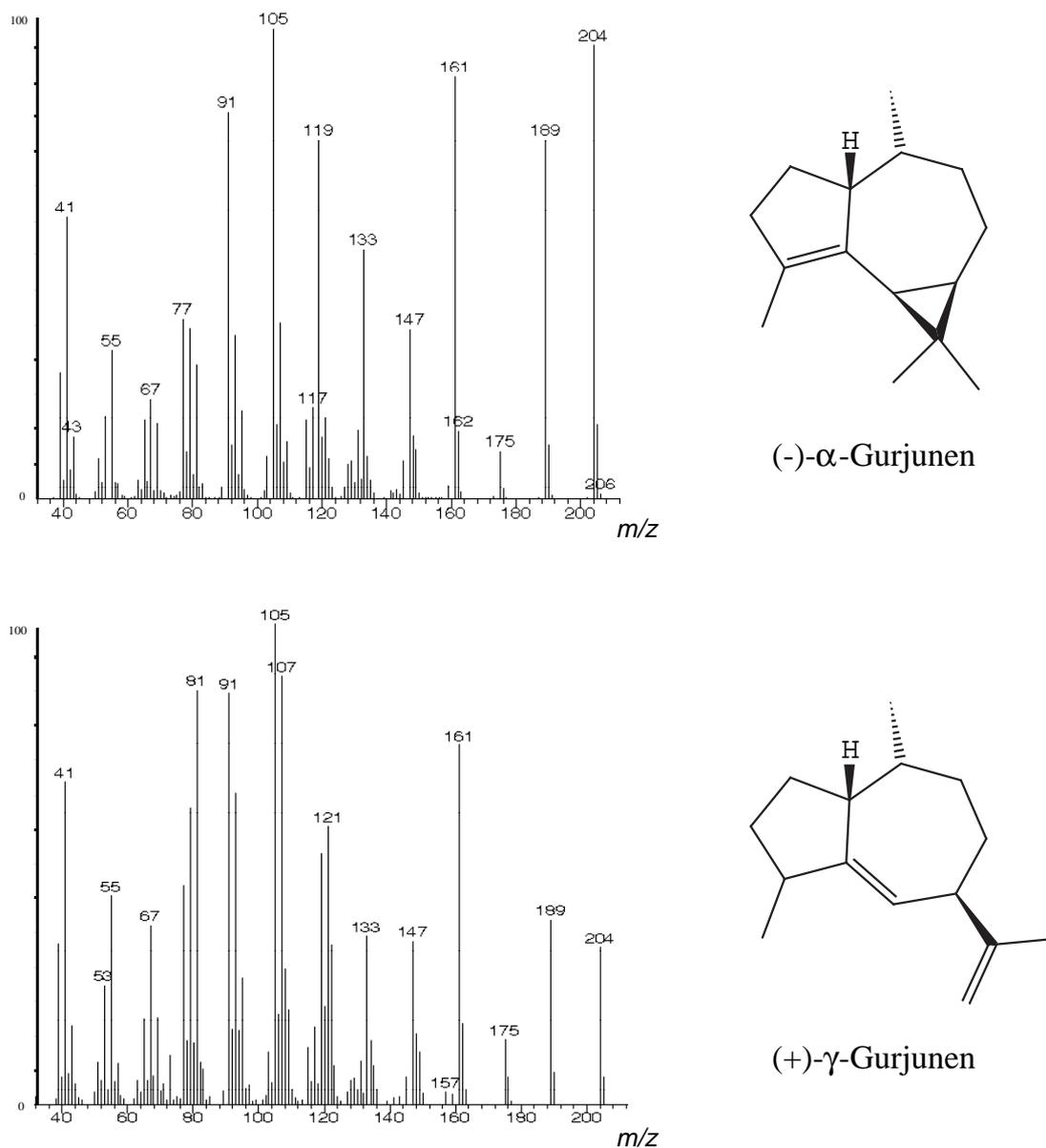
#### 4.6.4 Cyclisierungsmechanismus von (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase

Die DEAE-aufgereinigte Enzym-Fraktion wurde mit (*IR*)- $[1-^2\text{H}]$ -FDP, (*IS*)- $[1-^2\text{H}]$ -FDP und  $[10-^2\text{H}]$ -FDP inkubiert. Inkubationsprodukte wurden massenspektrometrisch analysiert (siehe Kapitel 4.6.2). Wie bereits in Kapitel 4.3.4 (Seite 57) ausführlich geschildert, handelt es sich bei der (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase um eine Multi-Produkt-Synthase, die zusätzlich (+)- $\gamma$ -Gurjunen synthetisiert. Somit mußten jeweils die Massenspektren von (-)- $\alpha$ -Gurjunen und (+)- $\gamma$ -Gurjunen analysiert werden. Um einen Vergleich der Spektren zu ermöglichen, zeigt Abb. 92 zunächst die Massenspektren von unmarkiertem (-)- $\alpha$ -Gurjunen und (+)- $\gamma$ -Gurjunen.

Das Vorhandensein eines Dreiringes {bei (-)- $\alpha$ -Gurjunen} bzw. einer Isopropylengruppe {bei (+)- $\gamma$ -Gurjunen} erschwert es, Aussagen über mögliche Zerfallsmuster zu machen.

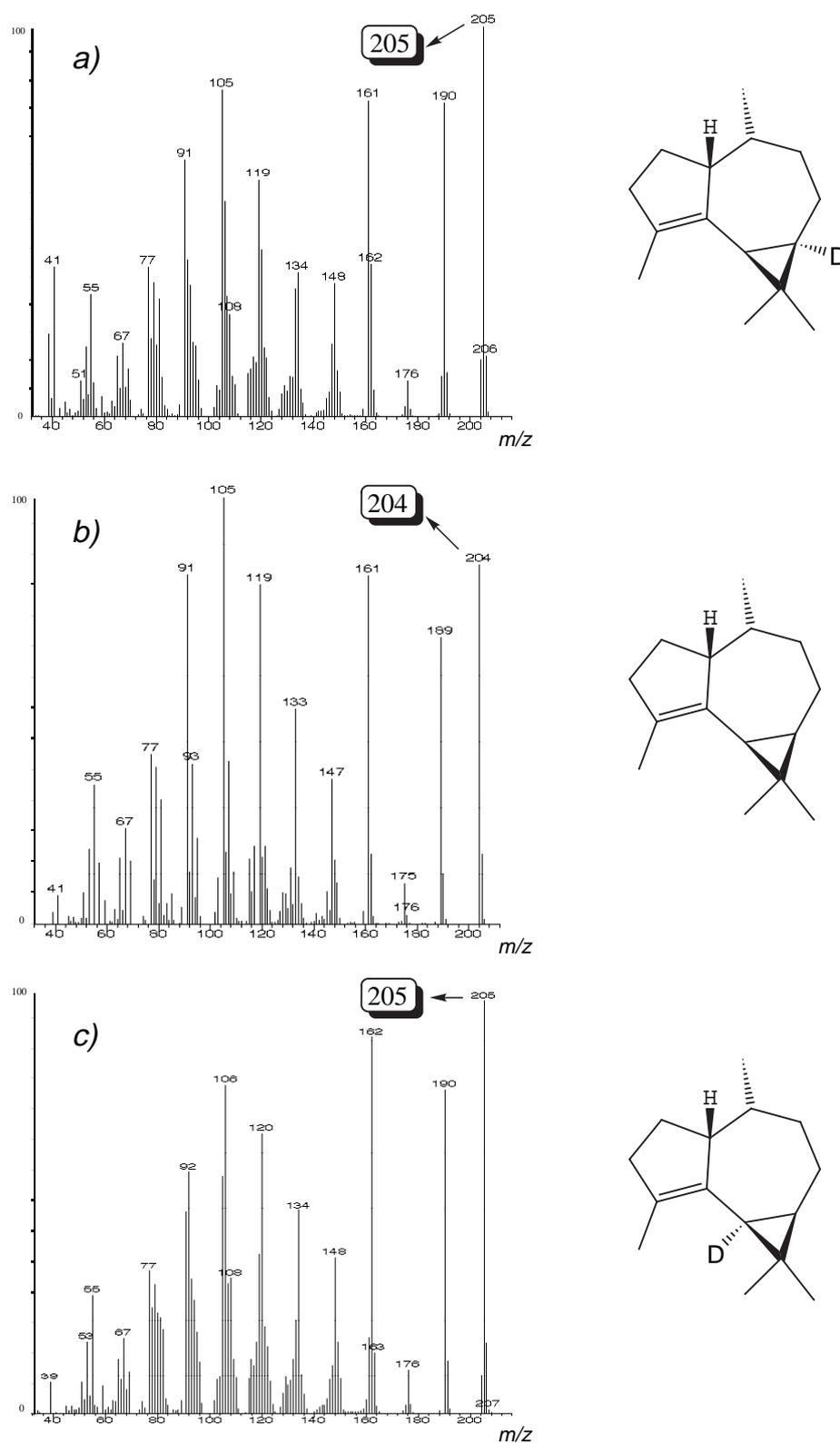
Abb. 93 zeigt die Massenspektren von (-)- $\alpha$ -Gurjunen als Inkubationsprodukt verschiedener FDP-Substrate.

Die Massenspektren liefern ein überraschendes Ergebnis: Deuteriumatome aus (*IS*)- $[1-^2\text{H}]$ -FDP und  $[10-^2\text{H}]$ -FDP werden in das Zielmolekül eingebaut, wie durch die Molekülmasse von  $m/z = 205$  ( $\text{C}_{15}\text{H}_{23}^2\text{H}$ ) bewiesen wird (Abb. 93a und c). Das Deuteriumatom aus (*IR*)- $[1-^2\text{H}]$ -FDP wird hingegen nicht in (-)- $\alpha$ -Gurjunen eingebaut (Abb. 93b), das Massenspektrum zeigt einen Molekülpeak bei  $m/z = 204$  und ist identisch mit dem der unmarkierten Verbindung. Zusätzliche Inkubationen mit  $[1,1-^2\text{H}_2]$ -FDP zeigten als Inkubationsprodukt (-)- $\alpha$ -Gurjunen mit einem Molekülpeak bei  $m/z = 205$ , d.h. es wird nur eines der beiden Deuterium-Atome aus der 1-Position von FDP in das Zielmolekül eingebaut. Die Ergebnisse der Inkubationen mit (*IR*)- $[1-^2\text{H}]$ -FDP sind somit keine Artefakte.



**Abb. 92** Massenspektren (EI, 70 eV) von (-)-α-Gurjunen und (+)-γ-Gurjunen.

Aufgrund eines intensiven Signal-Scramblings in den Massenspektren der deuterierten Verbindungen (z.B. ähnliche Intensitäten von  $m/z = 161$  und  $m/z = 162$  in Abb. 93a) gelingt es nicht, eine Zuordnung von Molekülfragmenten zu bestimmten Signalen durchzuführen. Somit bleibt zunächst ungeklärt in welcher Position sich die Deuterium-Atome befinden. Das Scrambling ist darauf zurückzuführen, daß das Dreiringsystem in dem Molekül gespalten wird und dabei eine Reihe von nicht vorhersagbaren Folgereaktionen (Umlagerungen etc.) ablaufen.



**Abb. 93** Massenspektren (EI, 70 eV) von (-)-α-Gurjunen als Inkubationsprodukt von [10-<sup>2</sup>H]-FDP (a); (1R)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP (b) und (1S)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP (c).

Die Massenspektren des als Nebenprodukt produzierten (+)- $\gamma$ -Gurjunens wurden ebenfalls analysiert (Abb. 94).

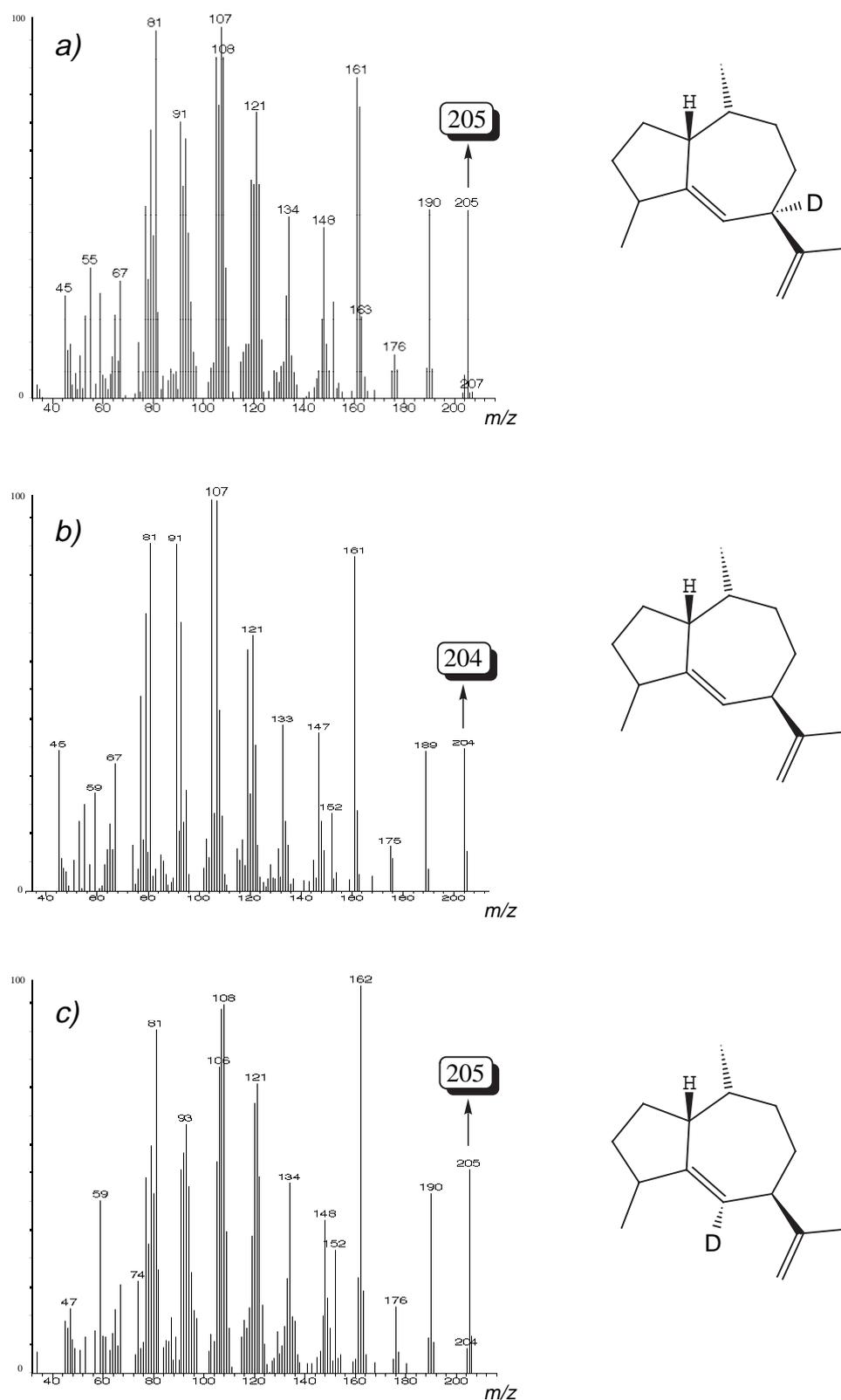
Die Massenspektren zeigen ähnliche Ergebnisse wie bei (-)- $\alpha$ -Gurjunen. Die Deuterium-Atome aus (*IS*)-[1- $^2\text{H}$ ]-FDP und [10- $^2\text{H}$ ]-FDP werden in das Zielmolekül eingebaut {bewiesen durch die Molekülmasse von  $m/z = 205$  ( $\text{C}_{15}\text{H}_{23}^2\text{H}$ ), Abb. 94a und c}, während Deuterium aus (*IR*)-[1- $^2\text{H}$ ]-FDP nicht in (+)- $\gamma$ -Gurjunen eingebaut wird (Molekülmasse:  $m/z = 204$ , Abb. 94b). Scrambling in den Spektren verhindert die Zuordnung von Fragmenten zu bestimmten Signalen. Eine Bestimmung der Deuterium-Position in den Molekülen ist daher mit Hilfe der Massenspektren nicht möglich.

Die Postulierung eines Cyclisierungsmechanismus ist auch ohne genaue Kenntnis der Deuterium-Positionen möglich. Dabei wird sich die Tatsache zu nutze gemacht, daß es sich um eine Multi-Produkt-Synthese handelt. Der Mechanismus muß folgende Bedingungen erfüllen:

- Es muß ein kationisches Intermediat geben, das sowohl zu (-)- $\alpha$ -Gurjunen, als auch zu (+)- $\gamma$ -Gurjunen weiterreagieren kann. Nur so kann die Fähigkeit der Synthese erklärt werden, beide Produkte zu synthetisieren.
- Die Reaktion muß so ablaufen, daß pro-*S*-H-1 und H-10 von FDP sowohl in (-)- $\alpha$ -Gurjunen, als auch in (+)- $\gamma$ -Gurjunen eingebaut werden.

Weiterhin muß die Reaktion so ablaufen, daß pro-*R*-H-1 von FDP während der Cyclisierung irreversibel abgespalten wird (z.B. durch Übertragung auf eine Aminosäure des Aktiven Zentrums der Synthese).

Abb. 95 zeigt einen möglichen Mechanismus, der alle genannten Bedingungen erfüllt. Erster Schritt ist die bereits bekannte Abspaltung von Diphosphat aus FDP unter Bildung eines Germacrenylkations (Kation 1), das identisch ist mit den Germacrenylkationen aus den (+)- und (-)-Germacren-D-Synthese-Mechanismen (siehe Kapitel 4.6.2 und 4.6.3). An Kation 1 erfolgen dann verschiedene Umlagerungen und insgesamt drei 1,2-Hydrid-Shifts, so daß letztlich Kation 6 gebildet wird. An dieser Stelle wird ein Proton irreversibel von dem Kation abstrahiert und auf die Synthese übertragen, dabei handelt es sich um das ehemalige pro-*R*-H-1 vom Substrat FDP. Aus Kation 6 wird Isoleden gebildet, das allerdings am Enzym gebunden bleibt und dort zu Kation 7 reprotoniert wird.



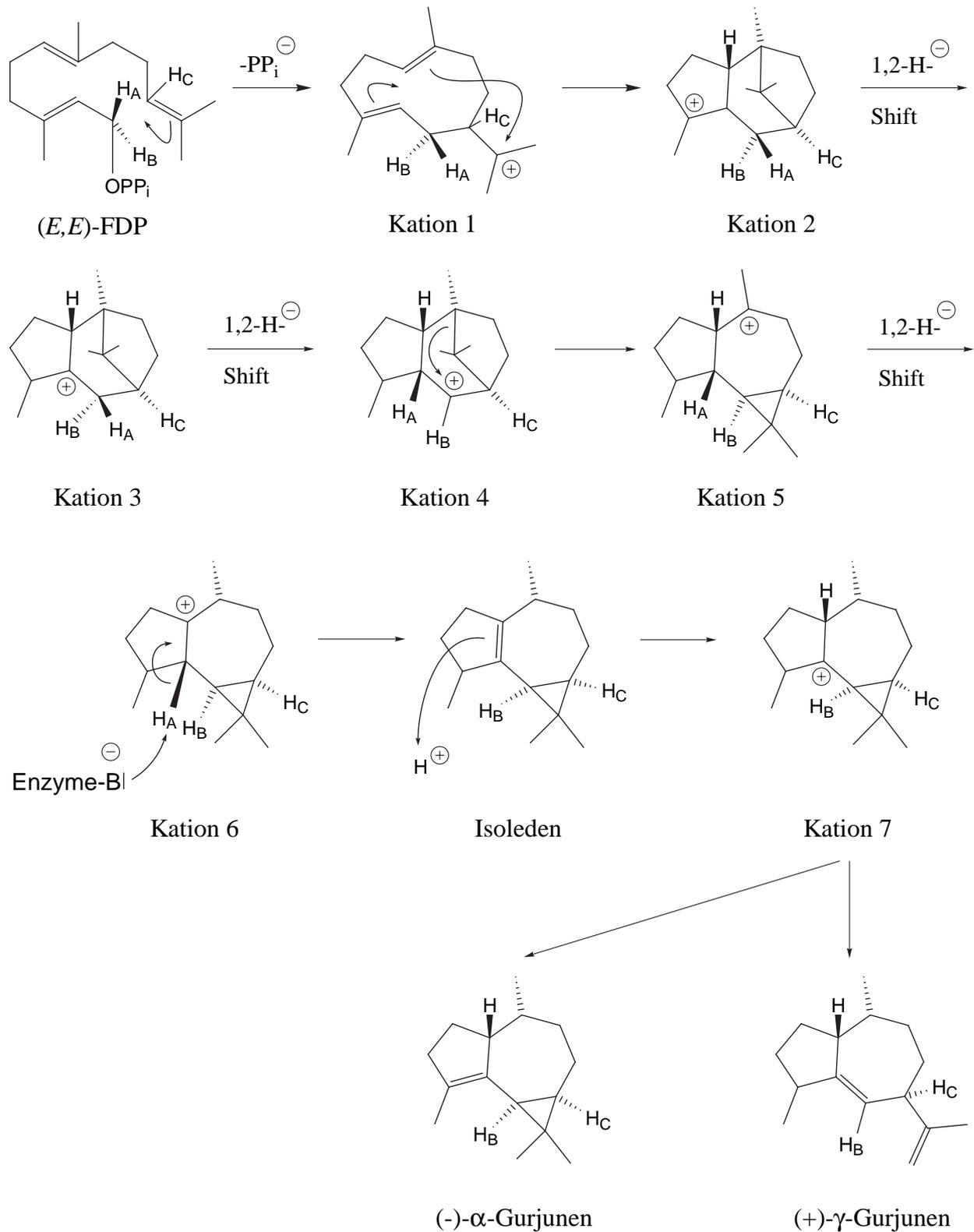
**Abb. 94** Massenspektren (EI, 70 eV) von (+)- $\gamma$ -Gurjunen als Inkubationsprodukt von [10- $^2$ H]-FDP (a); (*IR*)-[1- $^2$ H]-FDP (b) und (*IS*)-[1- $^2$ H]-FDP (c).

Kation 7 ist der Verzweigungspunkt der Reaktion. Um die positive Ladung des Kations ausgleichen zu können, stehen zwei verschiedene Möglichkeiten der Protonenabstraktion zur Verfügung; eine führt zur Bildung von (-)- $\alpha$ -Gurjunen, die andere zur Bildung von (+)- $\gamma$ -Gurjunen. Die Synthese scheint in der Lage zu sein, die kationischen Zwischenprodukte 1 bis 6 sowie Isoleden an sich zu binden, während die Kapazität Kation 7 zu binden etwas reduziert ist. Dies führt dazu, daß Kation 7 von dem Enzym „abfallen“ kann (in 9% der Fälle) und dann zu dem stabileren (+)- $\gamma$ -Gurjunen reagiert. Das instabilere (-)- $\alpha$ -Gurjunen wird ebenfalls aus Kation 7 gebildet, allerdings nur unter Katalyse der Synthese (in 91% der Fälle).

Der postulierte Mechanismus ist in der Lage alle Markierungsexperimente richtig zu deuten und liefert gleichzeitig eine Erklärung für die „Multi-Produkt-Synthese-Eigenschaften“ der Synthese.

Durch das starke Scrambling der Signale in den Massenspektren erschien die Aufnahme von Linked Scan-Messungen wenig erfolgversprechend, sie wurden daher nicht durchgeführt. Da die experimentellen Befunde keine ausreichende Auskunft über die Konfiguration der Stereozentren in den kationischen Intermediaten geben, erschien auch Molecular Modelling nicht sinnvoll.

Aus den obengenannten Gründen ist der in Abb. 95 gezeigte Cyclisierungsmechanismus nur als Postulat zu betrachten, das nicht endgültig bewiesen werden kann. Der Mechanismus ist so komplex, daß er abschließend nur durch NMR-spektroskopische Methoden bewiesen werden könnte. Dazu müßte die Synthese aber in wesentlich größeren Mengen vorliegen, d.h. ihre cDNA müßte isoliert und z.B. in *E. coli* exprimiert werden, um große Mengen der Produkte synthetisieren zu können. Ein solches Vorgehen war allerdings nicht mehr Aufgabe der vorliegenden Dissertation.



**Abb. 95** Postulierter Cyclisierungsmechanismus für (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthese.

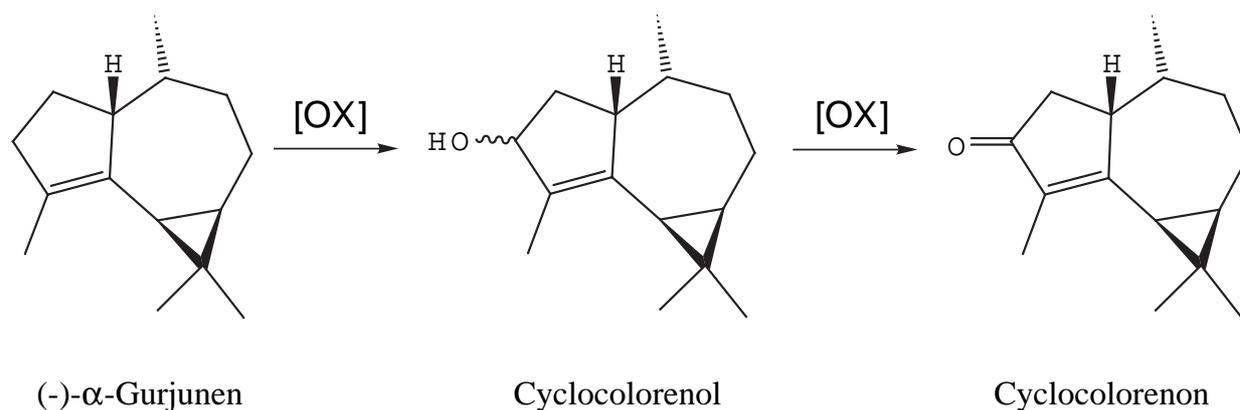
## 4.7 Ausblick: Verbleib von (-)- $\alpha$ -Gurjunen in *S. canadensis*

Die Isolierung der (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase zeigte bereits, daß von einem *S. canadensis* Enzymrohextrakt (-)- $\alpha$ -Gurjunen in vergleichbaren Mengen wie Germacren D synthetisiert wird (Kapitel 4.3.4, Seite 57). Die Analyse des ätherischen Öls zeigte hingegen, daß im Durchschnitt 3% (-)- $\alpha$ -Gurjunen und 50% Germacren D (beide Enantiomere zusammengezählt) in dem Öl vorhanden sind. Anstelle einer hohen  $\alpha$ -Gurjunen Konzentration wird in dem ätherischen Öl eine hohe (-)-Cyclocolorenon-Konzentration gefunden. Einen Vergleich der Produktverhältnisse im Enzymextrakt und ätherischen Öl<sup>[107]</sup> zeigt Tab. 14.

Verbindung	Anteil (%) im ätherischen Öl	Anteil (%) in Assays des Enzymrohextraktes
(+)/(-)-Germacren D	45	50
(-)- $\alpha$ -Gurjunen	3	42
(+)- $\gamma$ -Gurjunen	3	4
(-)-Cyclocolorenon	38	0

**Tab. 14** Prozentuale Zusammensetzung der Verbindungen im ätherischen Öl und in Assays des Enzymrohextraktes von *S. canadensis* (die Werte sind gemittelt aus den Ergebnissen verschiedener Pflanzenmaterialien).

Die Ergebnisse der Enzymrohextrakte bewiesen, daß die Pflanze eine große Menge (-)- $\alpha$ -Gurjunen produziert. Der niedrige Anteil von (-)- $\alpha$ -Gurjunen im ätherischen Öl ist somit ein klares Indiz für seine „Weiterverwendung“ durch die Pflanze. Es ist naheliegend, daß (-)- $\alpha$ -Gurjunen *in vivo* oxidiert wird. Tab. 14 zeigt, daß das wahrscheinlichste Oxidationsprodukt das Sesquiterpenketon (-)-Cyclocolorenon ist. Ein Vergleich der Strukturen von (-)- $\alpha$ -Gurjunen und Cyclocolorenon suggeriert eine biogenetische Verwandtschaft beider Verbindungen. Abb. 96 zeigt den Verlauf einer möglichen Oxidation von (-)- $\alpha$ -Gurjunen zu Cyclocolorenon *in vivo*.



**Abb. 96** Mögliche Biogenese von (-)-Cyclocolorenol.

Wie bereits aus der Biosynthese von anderen Terpenketonen bekannt ist (siehe Carvon Biosynthese, Kapitel 3.2.4, Seite 30), können Terpene durch Cytochrom P450-Monooxygenasen zu Alkoholen oxidiert werden. Die Alkohole werden dann durch Dehydrogenasen zu Ketonen oxidiert.

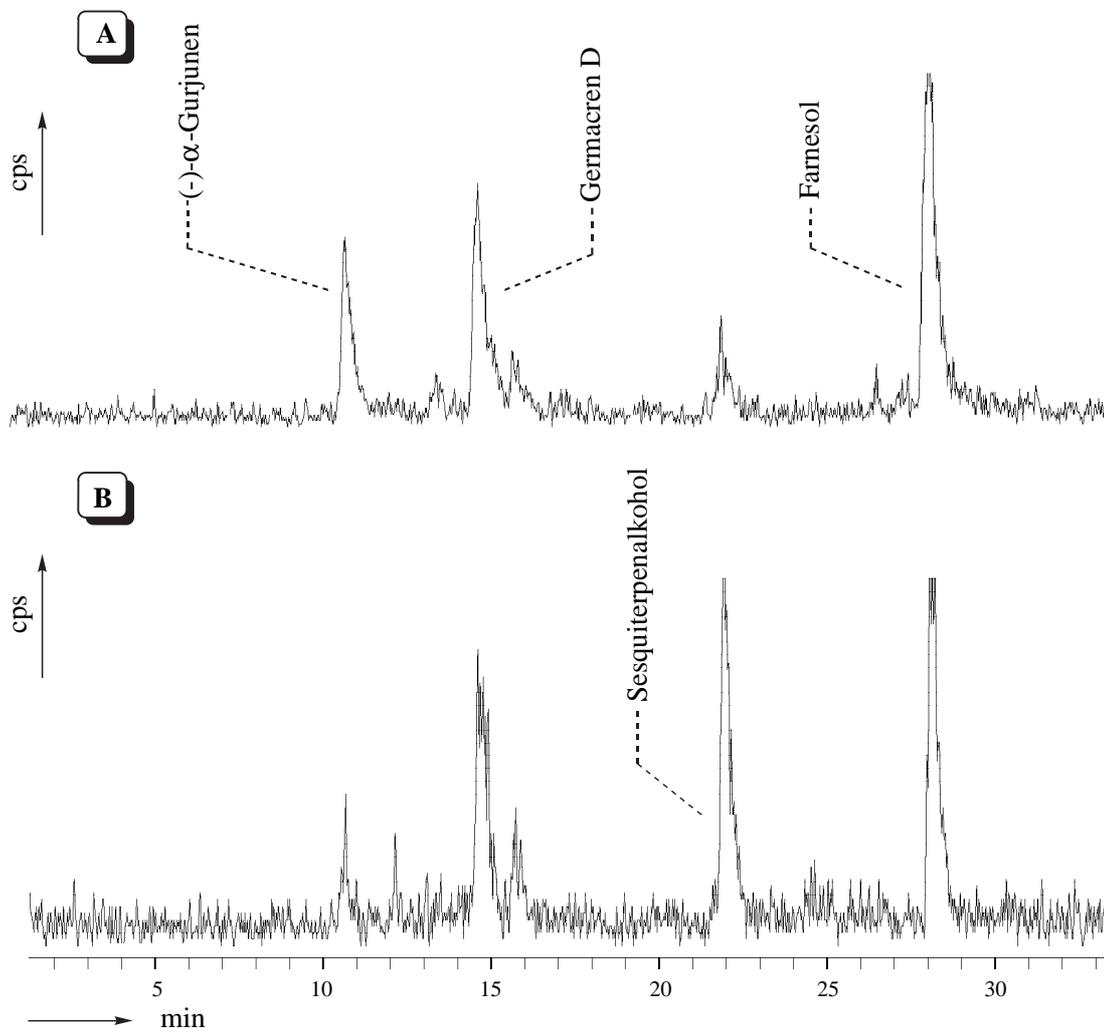
Cytochrom P450-Monooxygenasen sind membranständige Enzyme, die eine Häm-Gruppe besitzen. Die Enzyme sind über einen „Proteinanker“ an Membranen gebunden. Als Co-Faktoren benötigen sie NADPH und O<sub>2</sub>. Als Elektronendonator der Monooxygenasen fungiert ein weiteres Enzym, die NADPH: Cytochrom P450-Reduktase, die stets neben der Monooxygenase an eine Membran gebunden ist und FAD bzw. FMN als Co-Faktor benötigt<sup>[136]</sup>.

Die Erstellung eines 100,000g Überstandes als Enzymrohextrakt hat zur Folge, daß sämtliche Membranreste und microsomale Bestandteile aus dem Extrakt entfernt werden. Auch ein Großteil der Monooxygenasen sind somit aus dem Rohextrakt entfernt. Inkubationen des Rohextraktes mit FDP synthetisieren dann zwar (-)-α-Gurjunen, da die oxidierenden Enzyme aber größtenteils fehlen, bleibt die Biosynthese von Cyclocolorenol bereits auf der Stufe des Sesquiterpens stehen\*. Dies erklärt die Diskrepanz der Produktverteilung im Rohextrakt und im ätherischen Öl.

Um diese Hypothese zu prüfen, wurde ein modifizierter Enzymrohextrakt hergestellt. Anstelle einer 100,000g Zentrifugation wurde nur eine 4,500g Zentrifugation durchgeführt, so daß sich sämtliche Monooxygenasen im Extrakt befanden. Der Extrakt wurde dann in einem ebenfalls modifizierten Macroassay auf Enzymaktivität untersucht: neben dem Substrat [1-<sup>3</sup>H]-FDP wurden zusätzlich die Co-Faktoren für Monooxygenasen hinzugefügt (NADPH, FAD und FMN). Da NADPH nicht in großen Mengen zugefügt werden kann (es sollten höchstens katalytische Mengen verwendet werden), wird stattdessen

\* Ein weiteres Problem ist, daß unter Standardbedingungen des Macroassays der Co-Faktor NADPH für die Monooxygenasen nicht zugefügt wird. Allerdings befindet sich (zumindest im Enzymrohextrakt) noch eine gewisse Restmenge NADPH, so daß Oxidationsreaktionen nicht völlig ausgeschlossen sind.

ein NADPH erzeugendes System hinzugefügt. Es besteht aus NADPH (in katalytischen Mengen), Glucose-6-Phosphat und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase; dieses System ist in der Lage *in situ* frisches NADPH zu bilden. Produkte des Assays wurden in Diethylether extrahiert und mittels Radio-GC analysiert (Abb. 97).



**Abb. 97** Radio-GC-Analyse der Macroassay-Produkte des Standard-Enzymrohextraktes und des modifizierten Enzymrohextraktes (EconoCap EC-WAX-Kapillarsäule; 70°C für 1 min mit 5°C/min → 210°C). A: Radiosignal der Assay-Produkte vom 100,000g-Rohextrakt; B: Radiosignal der Assay Produkte vom 4,500g-Rohextrakt.

Ein Vergleich der Assay-Produkte eines „Standard“-100,000g-Rohextraktes mit den Produkten eines 4,500g-Rohextraktes (inkl. Assay, das NADPH, FAD und FMN enthält) zeigt deutliche Unterschiede. Während das Standard-Assay eine hohe Konzentration an (-)-α-Gurjunen synthetisiert und nur geringe Mengen eines Sesquiterpenalkohols (Abb. 97A), wird von dem 4,500g-Extrakt nur noch wenig α-Gurjunen und dafür eine größere Menge des Sesquiterpenalkohols synthetisiert (Abb. 97B). In beiden Fällen ist die synthetisierte Menge an Germacren D fast identisch, somit kann ausgeschlossen werden, daß



Eigene Versuche Cyclocolorenol auf dem in der Literatur beschriebenen Wege herzustellen, scheiterten an der Isolierung des Produktes. Nach der Synthese zeigte sich in einer GC-MS-Analyse, dass eine Vielzahl von Sesquiterpenalkoholen produziert wurden. Auch alternative Synthesen unter verschiedenen Reaktionsbedingungen und mit einem anderen Reduktionsmittel ( $\text{NaBH}_4$ ) lieferten eine komplexe Produktmischung. Eine Isolierung der jeweils synthetisierten Alkohole scheiterte, obwohl die Trennung an Kieselgel, an basischen Aluminiumoxid und mittels präparativer Gaschromatographie versucht wurde. Während der Trennungen erfolgten zahlreiche Umlagerungen und Dehydratisierungen zu weiteren Sesquiterpenalkoholen bzw. Sesquiterpenen-Kohlenwasserstoffen. Unter diesen Umständen erscheint es wahrscheinlich, daß Cyclocolorenol eine sehr labile Verbindung ist. Dies würde auch erklären, warum sie bisher nicht als Naturstoff identifiziert wurde.

*In vivo* könnte Cyclocolorenol direkt nach der Synthese von einer Monooxygenase an eine Dehydrogenase „weitergegeben“ werden, ohne dabei ins Cytosol zu gelangen (Multi-Enzymkomplex). Unter diesen Bedingungen scheint es relativ aussichtslos Cyclocolorenol als Assay-Produkt zu identifizieren. Der vom 4,500g-Enzymextrakt produzierte Sesquiterpenalkohol dürfte somit ein Umlagerungsprodukt von Cyclocolorenol sein\*.

---

\* Da im 4,500g-Rohextrakt Assay mit einem pH von 7.2 gearbeitet wurde, ist die Dehydrogenase des Multi-Enzymkomplexes inaktiv, produziertes Cyclocolorenol wird nicht weiter oxidiert, sondern verläßt den Komplex und lagert sich im wäßrigen Medium des Assays um.

## 5 Zusammenfassung

Die Aufklärung der Terpen-Biosynthese hat in den letzten zehn Jahren eine große Weiterentwicklung erfahren. Zunächst wurden nur relativ einfach zu isolierende Terpen-Synthasen aus Schimmelpilzen analysiert. Mittlerweile ist es durch den Einsatz moderner Enzym-Separationstechniken sogar möglich, Terpen-Synthasen aus höheren Pflanzen zu isolieren. Neben der Isolierung von Synthasen spielt auch die Analyse ihrer Funktionsweise eine entscheidende Rolle.

Die vorliegende Dissertation beschäftigte sich mit der Isolierung und Charakterisierung von drei neuen Sesquiterpen-Synthasen aus der höheren Pflanze *Solidago canadensis*. Zusätzlich wurden die Mechanismen der Produktbildung aufgeklärt.

### Isolierung von (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase

Da bislang die Biosynthese von Sesquiterpen-Enantiomeren nicht untersucht wurde, sollte nun die Biogenese beider Germacren D-Antipoden analysiert werden. Für die Untersuchungen wurde die höhere Pflanze *S. canadensis* ausgewählt, da in ihrem ätherischen Öl (+)- und (-)-Germacren D in vergleichbaren Verhältnissen gefunden wird. Dies ist eine seltene Ausnahme, da normalerweise von lebenden Organismen nur eines der möglichen Enantiomere einer chiralen Verbindung synthetisiert wird.

Es gelang zwei unterschiedliche Sesquiterpen-Synthasen aus der Pflanze zu isolieren:

- (+)-Germacren-D-Synthase, die enantiomerenreines (+)-Germacren D synthetisiert und
- (-)-Germacren-D-Synthase, die enantioselektiv (-)-Germacren D produziert.

Beide Synthasen wurden biochemisch charakterisiert. Die Analyse ihrer Molmasse, pH-Optimum und kinetischer Parameter zeigten, daß es sich um ähnliche Synthasen handelt, die dennoch in der Lage sind, die Biosynthese von verschiedenen Produkten zu katalysieren.

### Mechanistische Studien mit (+)- und (-)-Germacren-D-Synthase

Substrat der beiden Synthasen ist (*E,E*)-Farnesyldiphosphat (FDP). Für mechanistische Studien wurden Deuterium-markierte FDP-Analoga synthetisiert. Im einzelnen wurden folgende Substrate hergestellt:

- ◆ (*E,E*)-[1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Farnesyldiphosphat
- ◆ (*E,E*)-(1*R*)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesyldiphosphat
- ◆ (*E,E*)-(1*S*)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesyldiphosphat
- ◆ (*E,E*)-[10-<sup>2</sup>H]-Farnesyldiphosphat

Für die Synthesen waren teilweise enantioselektive Reaktionen nötig, die HLADH (Horse-Liver-Alcohol-Dehydrogenase) als chiralen Katalysator verwendeten.

Anschließende Inkubationen der isolierten (+)- und (-)-Germacren-D-Synthasen mit den deuterierten Substraten lieferte als Produkt deuterierte Germacren D-Enantiomere. Durch Bestimmung der Deuterium-Positionen in den Produkten war es möglich, für beide Synthasen einen Cyclisierungsmechanismus zu etablieren. Die Produkt-Analyse erfolgte unter Einsatz von GC-MS und Linked Scan-Massenspektrometrie.

Als Ergebnis wurde für (+)-Germacren-D-Synthase ein Mechanismus gefunden, der unter zweimaligem 1,2-Hydrid-Shift zum Produkt führt. (-)-Germacren-D-Synthase synthetisiert ihr Produkt via einem 1,3-Hydrid-Shift.

Es wurde erstmals bewiesen, daß eine Pflanze zwei unterschiedliche Enzyme besitzt, die für die Biosynthese von Sesquiterpen-Enantiomeren verantwortlich sind.

### **(-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase**

Das Sesquiterpenketon Cyclocoloronon wird ebenfalls in größeren Mengen im ätherischen Öl von *S. canadensis* gefunden. Seine Biosynthese verläuft vermutlich im ersten Schritt über die Bildung von (-)- $\alpha$ -Gurjunen. Die entsprechende Sesquiterpen-Synthase {(-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase} wurde ebenfalls aus der Pflanze isoliert und ihre biochemischen Parameter ermittelt.

Zudem wurde bewiesen, daß es sich bei der Synthase um eine „Multi-Produkt-Synthase“ handelt, die neben (-)- $\alpha$ -Gurjunen zu 9% (+)- $\gamma$ -Gurjunen synthetisiert. Diese Eigenschaft liegt vermutlich in der Art des Cyclisierungsmechanismus begründet.

Da höhere Pflanzen Sesquiterpen-Synthasen nur in geringen Konzentration besitzen, ist die Synthese von größeren Produktmengen ausgeschlossen. Somit ist die Möglichkeit der Mechanismus-Aufklärung unter Einsatz von NMR-Techniken erschwert. Inkubationen mit den oben genannten deuterierten Substraten ermöglichten es dennoch, einen Cyclisierungsmechanismus für die Synthase mit Hilfe von massenspektrometrischen Analysen zu postulieren. Der Mechanismus macht die Bildung von (+)- $\gamma$ -Gurjunen als Nebenprodukt plausibel. Da es sich um einen komplexen Prozess handelt, ist ein endgültiger Beweis dafür auf Grundlage von Massenspektren nicht möglich.

Die zukünftige Forschung im Bereich der Terpen-Biosynthese wird sich daher verstärkt dem Problem stellen müssen, Systeme zu erarbeiten, mit denen größere Mengen an Synthasen produziert werden können. An vielversprechender Ansatz scheint die Isolierung von Synthasen-cDNA und deren Expression in *E. coli* zu sein.

## 6 Summary

Over the last ten years, elucidation of terpene biosynthesis became more and more important. In the beginning, only those terpene synthases were analyzed which could easily be obtained from fungal sources. Meanwhile, highly sophisticated enzyme isolation techniques made it possible to use higher plants as source of terpene synthases. After the isolation of new synthases, consequently, also their mechanisms were investigated.

This work deals with the isolation and characterization of three new sesquiterpene synthases from the higher plant *Solidago canadensis*. Moreover, the mechanisms of product formation were examined for all three synthases.

### **Isolation of (+)- and (-)-germacrene D synthase**

Due to a lack of investigations in the area of enantiomeric sesquiterpene biosynthesis, the formation of both germacrene D enantiomers should be examined. To that end, the higher plant *S. canadensis* was chosen, because its essential oil contains (+)- and (-)-germacrene D in similar amounts. This is a rare exception for living organisms, which usually synthesize only one of the two possible enantiomers of a chiral compound.

Two distinctly different synthases were isolated from the plant:

- (+)-Germacrene D synthase, which produces enantiomerically pure (+)-germacrene D and
- (-)-Germacrene D synthase, which synthesizes enantioselectively (-)-germacrene D.

Biochemical properties of both synthases were investigated. Analysis of the molecular mass, optimum pH, and kinetic parameters indicated two very similar synthases. However, both synthases are able to catalyze the formation of different enantiomers.

### **Mechanistic studies of (+)- and (-)-germacrene D synthases**

Both synthases use the ubiquitous precursor farnesyl diphosphate (FDP) as a substrate. To perform mechanistic studies on the synthases, the following FDP analogues were synthesized carrying deuterium labels in different positions:

- ◆ (*E,E*)-[1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-farnesyl diphosphate
- ◆ (*E,E*)-(1*R*)-[1-<sup>2</sup>H]-farnesyl diphosphate
- ◆ (*E,E*)-(1*S*)-[1-<sup>2</sup>H]-farnesyl diphosphate
- ◆ (*E,E*)-[10-<sup>2</sup>H]-farnesyl diphosphate

For enantioselective synthesis, HLADH (Horse-Liver-Alcohol-Dehydrogenase) was utilized as chiral catalyst.

Incubations of the isolated (+)- and (-)-germacrene D synthase with the deuterated substrates gave rise to deuterated germacrene D enantiomers. Determination of the deuterium label in the products made it possible to establish cyclization mechanisms for both synthases. Product analysis was performed by using GC-MS and linked scan mass spectrometry.

The action of (-)-germacrene D synthase involves a 1,3-hydride shift, whereas (+)-germacrene D is formed via a double 1,2-hydride shift.

For the first time it was shown, that one plant species contains two different enzymes for the biosynthesis of sesquiterpene enantiomers.

### **(-)- $\alpha$ -Gurjunene synthase**

The sesquiterpene ketone cyclocolorenone is another main component of the essential oil of *S. canadensis*. It is likely that the sesquiterpene (-)- $\alpha$ -gurjunene is the biosynthetic precursor of cyclocolorenone. Therefore, also (-)- $\alpha$ -gurjunene synthase was isolated from *S. canadensis* and its biochemical properties were investigated.

Additionally, it was demonstrated, that (-)- $\alpha$ -gurjunene synthase is responsible for the formation of (+)- $\gamma$ -gurjunene in minor amounts (9%). Therefore, the cyclization mechanism of this multi-product synthase was elucidated.

Higher plants usually contain only low concentrations of sesquiterpene synthases e.g. the synthesis of higher product amounts is not feasible. For this reason it is also impossible to apply NMR techniques for the elucidation of cyclization mechanisms. Nevertheless, incubations of (-)- $\alpha$ -gurjunene synthase with the above mentioned FDP analogues followed by product analysis using GC-MS, made it possible to work out a hypothesis for the cyclization mechanism. This mechanism gives a reasonable explanation for the formation of (+)- $\gamma$ -gurjunene as a side product. A final prove for the mechanism by using exclusively mass spectrometry was impossible.

To overcome such problems, future research on terpene biosynthesis has to achieve a scale up of the synthase production. A promising practice could be the isolation of synthases cDNA and their expression in *E. coli*.

## 7 Experimenteller Teil

### 7.1 Geräte und Reagenzien

#### Lösungsmittel und Chemikalien

Lösungsmittel wurden von den Firmen *Merck*, *Fluka* und *Janssen Chimica* bezogen und in den Reinheitsgraden „p.a., absolut“ oder „HPLC-grade“ direkt verwendet. Lösungsmittel des Reinheitsgrades „zur Synthese“ wurden vor ihrer Verwendung destilliert. Diethylether und Pentan der Firma *Janssen Chimica* (Reinheitsgrad „p.a., absolut“) wurden vor Extraktionen von Enzymassays einer Feindestillation unterzogen, um kontaminierende Antioxidantien bzw. längerkettige Alkane zu entfernen. Deuterierte Lösungsmittel wurden von der Firma *Deutero* in 99.5% Reinheit verwendet.

Reagenzien für die Synthese von deuterierten Farnesyldiphosphaten wurden von den Firmen *Merck*, *Fluka* oder *Aldrich* bezogen. Reagenzien für die biochemische Analytik wurden von den Firmen *Sigma*, *Janssen Chimica*, *Acros*, *Whatman*, *Baker*, *Serva*, *Merck*, *Pharmacia-Biotech* und *Bio-Rad* verwendet.  $[1(n)\text{-}^3\text{H}]$ -Farnesyldiphosphat-triammoniumsalz wurde von der Firma *Amersham* und unmarkiertes FDP von der Firma *Sigma* erworben.

Standards der Sesquiterpene  $\alpha$ -Gurjunen und  $\gamma$ -Gurjunen wurden von der Firma *Fluka* bezogen.

#### Handhabung und Entsorgung gefährlicher Stoffe

Alle kommerziell erworbenen Stoffe (siehe vorstehenden Absatz) wurden bezüglich ihres Gefährdungspotentials und ihrer Entsorgung entsprechend den Herstellerangaben behandelt. Für die synthetisierten Verbindungen lagen keine toxikologischen Untersuchungen bzw. Gefahrenhinweise vor. Die somit „unbekannten Stoffe“ wurden daher wie Giftstoffe behandelt und in gelöster Form in Sammelbehältern für nicht halogenierte Lösungsmittel entsorgt.

Sämtliche Versuche mit  $[1(n)\text{-}^3\text{H}]$ -FDP wurden in speziell ausgestatteten Labors für die Handhabung von Radioaktivität in Wageningen (NL) an dem dortigen „Instituut voor Agrobiologisch en Bodemvruchtbaarheidsonderzoek, Dienst Landbouwkundig Onderzoek (AB-DLO)“ durchgeführt („C-level Lab“ nach niederländischer Klassifizierung). Die Arbeiten mit den  $\beta$ -Strahlern wurden unter Anwendung spezieller Sicherheitsprotokolle des „Office of Safety and Environmental Hygiene of the DLO (BVM-DLO)“ durchgeführt. Radioaktive Produkte wurden in Sammelbehältern für radioaktiv kontaminierte Substanzen entsorgt.

## Lagerung und Verwendung von empfindlichen Substanzen

Sämtliche chemischen Reaktionen die absolute Lösungsmittel erforderten, wurden unter einer Stickstoff-Schutzgasatmosphäre ausgeführt. Synthetisierte Farnesyldiphosphate wurden vor ihrer Verwendung an einer Gefriertrocknungsanlage der Firma *Christ* (Modell Beta A) lyophilisiert und entweder in fester Form unter N<sub>2</sub>-Schutzgasatmosphäre aufbewahrt oder in 6.6 mM Lösung {33% (v/v) Ethanol in wäßriger 200 mM Ammoniumcarbonat-Lösung} für Inkubationen verwendet. Unmarkiertes FDP der Firma *Sigma* wurde in einer Lösung von Methanol {70% (v/v)} in wäßriger Ammoniak-Lösung (10 mM) gelagert. Für Inkubationen wurde das Lösungsmittel *in vacuo* mittels einer Gyrovap GT Gefriertrocknungsanlage abdestilliert und das FDP in einer 10 mM Vorratslösung (50% v/v Ethanol in wäßriger 200 mM Ammoniumcarbonat-Lösung) verwendet.

## Dünnschicht-Chromatographie

Für dünnschichtchromatographische Bestimmungen wurde Aluminiumfolie der Firma *Merck* verwendet, die mit Kieselgel 60 F<sub>254</sub> beschichtet war (Schichtdicke 0.2 mm). Die Detektion erfolgte durch Aufsprühen einer 10% ethanolschen Schwefelsäurelösung mit anschließender Verkohlung der Substanzen durch einen Heißluftfön.

## Flüssig-Chromatographie

Säulenchromatographische Trennungen wurden an Kieselgel 60 (0.040 – 0.063 mm) der Firma *Macherey-Nagel* durchgeführt. Die Säulen wurden bei einem Überdruck von 0.2 - 0.4 bar („Flash-Bedingungen“) betrieben.

## Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie (HPLC)

Präparative Trennungen erfolgten an einer Säule mit RP-18 Phase (20 cm · 2.5 cm, LiChrosorb RP18 der Firma *Bischoff*), für analytische Trennungen wurde ebenfalls eine RP-18 Phase verwendet (RP-18 „Prodigy“ der Firma *Phenomenex*). Als HPLC Pumpe wurde eine L-6200-Intelligent-Pump der Firma *Merck-Hitachi* verwendet. Die Probendetektion erfolgte mit einem UV-Detektor 655 A der Firma *Merck-Hitachi* bei 214 nm. UV-Signale wurden von einem Integrator D-2500 der Firma *Merck-Hitachi* ausgewertet. Sämtliche verwendeten Lösungsmittel wurden vor ihrer Verwendung entgast.

## Kapillargaschromatographie

Sämtliche gaschromatographischen Analysen wurden mit den Geräten Fractovap 2150 und 4160 der Firma *Carlo Erba*, sowie mit einem Dani 3900 und Micromat 412 der Firma *Orion* durchgeführt. Die Geräte waren mit einem Splitinjektor ausgestattet und die Detektion erfolgte mittels Flammenionisationsdetektor (FID). Die Injektortemperatur betrug

jeweils 200°C, die Detektortemperatur 250°C. Als Trägergas diente Wasserstoff. Die Aufnahme und Integration der Chromatogramme erfolgte mit den Integratoren D-2000 und D-2500 der Firma *Merck-Hitachi* sowie mit einem HP 3390 A der Firma *Hewlett-Packard*.

### **Präparative Gaschromatographie**

Es wurden für die präparative Gaschromatographie modifizierte Gaschromatographen des Typs Varian 1400 bzw. Varian 2800 genutzt. Trennungen erfolgten an einer gepackten Säule mit 2,6-Me-3-Pe- $\beta$ -CD-Phase (2.00 m x 5.3 mm Innendurchmesser, gepackt mit Chromosorb G-HP (*Merck*), das mit 2.5% einer 1:1-Mischung von Polysiloxan OV-1701 und 2,6-Me-3-Pe- $\beta$ -CD belegt war). Die Probeninjektion erfolgte direkt auf die Säulen, die Detektion erfolgte per FID. Die Injektor-Temperatur betrug 200°C, die Detektortemperatur 250°C. Als Trägergas diente Helium, eluierte Substanzen wurden in Teflonschläuchen bei 77 K ausgefroren.

### **Radio-Gaschromatographie**

Radio-GC-Analysen wurden durchgeführt mit einem Fractovap 4160 Gaschromatograph der Firma *Carlo-Erba*, der an einen RAGA 93 Radioaktivitätsdetektor der Firma *Raytest* gekoppelt war. Der Gaschromatograph war ausgerüstet mit einer 25 m Kapillarsäule mit 6T-2,3-Me- $\beta$ -CD Phase (50 % in OV 1701, w/w), bzw. mit einer 30 m Kapillarsäule, die mit einem 0.25  $\mu$ m dickem Film von PEG belegt war (EconoCap EC-WAX, der Firma *Alltech Nederland BV*). Proben wurden im kalten „On-Column-Modus“ injiziert, als Trägergas diente Wasserstoff. Ca. 20% des Säulen-Eluats wurden für eine Flammenionisationsdetektion mittels eines Splitventils zu einem FID (Detektortemperatur 270°C) geleitet. Die verbleibenden 80% des Eluats wurden mit H<sub>2</sub> versetzt (3 mL min<sup>-1</sup>) und zu einem Reaktor umgeleitet, der mit Platin-Chips (800°C) gefüllt war. Hier erfolgte eine quantitative Reduktion aller organischen Substanzen. Hinter dem Reaktor wurde dem Gasstrom CH<sub>4</sub> als Quenchinggas zugefügt, bis ein Gesamt-Flow von 36 mL min<sup>-1</sup> erreicht war. Danach erfolgte die Detektion von gasförmigen radioaktiven Produkten per Radioaktivitätsdetektor (5 mL Zählrohr).

### **Szintillationsdetektion**

Tritiumhaltige Verbindungen, die nicht in der Gasphase vorlagen, wurden in 4.5 mL „Szintillations-Cocktail“ Ultima Gold<sup>TM</sup> der Firma *Packard* gelöst und mit dem Szintillationszähler TRI-CARB 2100 TR der Firma *Packard* analysiert. Die Angabe der gemessenen Radioaktivität erfolgte in dpm (disintegrations per minute, 1000 dpm = 0.45 nCi = 16.7 Bq).

## Geräte für biochemische Arbeiten

Alle biochemischen Arbeiten wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Für Zentrifugationen bis 20,000g wurde die Laborzentrifuge 2K15 der Firma *Sigma* verwendet, für Ultrazentrifugationen bis 100,000g eine Centrikon T-2000 Zentrifuge von *Kontron Instruments*. Der Wechsel von Pufferlösungen für Enzymextrakte wurde mit Hilfe von Entsalzungssäulen des Typs Econo-Pac® 10 DG der Firma *Bio-Rad* (3 mL Kapazität) bzw. Entsalzungssäulen des Typs HiTrap™ der Firma *Pharmacia* (1.5 mL Kapazität) durchgeführt, die Säulen wurden den Herstellerangaben folgend betrieben. Sofern nötig, wurde das Volumen von Enzymextrakten reduziert durch Aufkonzentration der Proben mittels Ultrafiltration bei 5.000g in Centricon 30 Konzentratoren der Firma *Amicon*.

## Fast-Protein-Liquid-Chromatography (FPLC)

Trennungen von Proteinen erfolgten an einem FPLC-System der Firma *Pharmacia-Biotech*, das mit zwei P500-Pumpen, einem Leitfähigkeitsdetektor und einem UV-Detektor ausgestattet war. Sämtliche verwendeten Puffer wurden vor ihrer Verwendung entgast. Für unterschiedliche Trennungen wurden folgende Säulen verwendet: MonoQ HR 5/5 (1 mL) der Firma *Pharmacia*, Superdex75 HR 10/30 der Firma *Pharmacia* und eine 5 x 200 mm Säule, gepackt mit sphärischen Hydroxylapatit (15 µm) der Firma *Merck*.

## SDS-PAGE

SDS-PAGE wurde mit Hilfe eines Gelelektrophorese-Standes der Firma *Bio-Rad* durchgeführt. Für die Gelelektrophorese wurden „Ready-Gels“ der Firma *Bio-Rad* verwendet (10% Tris-HCl), die Durchführung erfolgte anhand von Herstellerangaben. Für die Kalibrierung der Gele wurden folgende Proteinstandards verwendet: α-Lactalbumin (14.4 kDa), Soybean Trypsin Inhibitor (20.1 kDa), Carbonic Anhydrase (30.0 kDa), Ovalbumin (45.0 kDa), Rinder-Serumalbumin (67.0 kDa) und Phosphorylase b (94.0 kDa). Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch Silver Staining mit dem „Silver-Stain-Kit“ der Firma *Bio-Rad*.

## Protein-Assays

Die Protein-Konzentration von Enzymextrakten wurde mit dem Coomassie Plus-Assay der Firma *Pierce* bestimmt. Enzymextrakte, die Tween 20 enthielten, wurden zunächst mittels einer Entsalzungssäule in eine 50 mM Ammoniumcarbonat-Lösung überführt und anschließend ihre Protein Konzentrationen mit Hilfe des Micro-BCA-Protein-Assays der Firma *Pierce* bestimmt. Als Kalibrierungsstandard für beide Assays wurde Rinder-Serumalbumin verwendet. Beide Assays bestimmen Protein-Konzentrationen anhand

photometrischer Messungen. Diese wurden mit einem UV-VIS-Spektrometer UV-160 A der Firma *Shimadzu* durchgeführt.

### Massenspektrometrie

Die massenspektrometrischen Analysen wurden an dem Sektorfeld-Gerät VG70-250S der Firma *VG Analytical*, bzw. an dem HP 5927A Mass Selective Detector der Firma *Hewlett-Packard* durchgeführt. Die Messungen erfolgten mittels Elektronenstoßionisation (EI) bei 70 eV.

Für die Linked Scan-Massenspektrometrie wurde das Sektorfeld-Gerät VG 70-250 SE, Firma *VG Analytical*, verwendet. Die Analysen erfolgten im GC-MS-Modus. Das Massenspektrometer war an den Gaschromatographen HP 5890 der Firma *Hewlett-Packard* gekoppelt, der ausgerüstet war mit einer 25 m Kapillarsäule, belegt mit der chiralen Trennphase 6T-2,3-Me- $\beta$ -CD (50 % in OV 1701, w/w). 1  $\mu$ L der Proben wurde jeweils im „Splitless Mode“ bei einer Injektor-Temperatur von 200°C injiziert. Helium diente als Trägergas. Die Messungen erfolgten mittels EI bei 70 eV. Während der GC-MS-Analyse wurden mit Hilfe eines elektronischen Datenerfassungssystems abwechselnd normale Scans und Linked Scans in der ersten feldfreien Region durchgeführt.

### NMR-Spektroskopie

Die Messungen der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren erfolgten mit den Geräten WM 400 ( $^1\text{H}$ : 400 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 100.62 MHz) und DRX 500 ( $^1\text{H}$ : 500 MHz,  $^{13}\text{C}$ : 125.77 MHz) der Firma *Bruker*. Die Messungen von  $^{31}\text{P}$ -NMR erfolgten an einem *Gemini 200 BB* Gerät ( $^{31}\text{P}$ : 81 MHz). Lösungsmittel waren  $\text{CDCl}_3$ , und  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Als Referenzsignale dienten jeweils Signale der unmarkierten Verbindungen der verwendeten Lösungsmittel:  $\text{CHCl}_3$  ( $^1\text{H}$ :  $\delta = 7.26$  ppm,  $^{13}\text{C}$ :  $\delta = 77.7$  ppm) und  $\text{CH}_3\text{OH}$  ( $^1\text{H}$ :  $\delta = 3.31$  ppm,  $^{13}\text{C}$ :  $\delta = 49$  ppm). Für  $^{31}\text{P}$ -NMR Messungen wurde als Referenz ein externer Phosphorsäure Standard verwendet (0.0 ppm). Zusätzlich zu  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren wurden jeweils auch  $^{13}\text{C}$ -DEPT-NMR-Spektren aufgenommen. Es werden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett.

## 7.2 Chemischer Teil

In den folgenden Kapiteln wird die Isolierung von Germacren D-Standards bzw. die Synthese von deuterierten Farnesyldiphosphaten beschrieben. Da es sich bei allen Verbindungen um Literatur-bekannte Substanzen handelt, wird für eine genauere Interpretation der NMR-Spektren auf die Literatur verwiesen (in allen Fällen stimmten die chemischen Verschiebungen, bzw. Kopplungskonstanten mit den Literaturwerten überein).

Deuterierungsgrade wurden anhand der  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren bestimmt<sup>[124]</sup>. Sämtliche Verbindungen lagen in einer Reinheit > 95% vor, die Reinheitsbestimmung erfolgte (sofern nicht anders vermerkt) mittels Kapillargaschromatographie. Für die Nummerierung der Moleküle siehe Abb. 72, Seite 84.

### 7.2.1 Isolierung von (+)- und (-)-Germacren D

Ca. 50 g Blätter von *Solidago canadensis* wurden in einem Homogenisator zerkleinert und einer zweistündigen Wasserdampfdestillation unterzogen. Leichtflüchtige Verbindungen wurden in Hexan p.a. aufgefangen.

Eine Isolierung von (+)- und (-)-Germacren D erfolgte aus dem ätherischen Öl mittels präparativer Gaschromatographie an einer 2,6-Me-3-Pe- $\beta$ -CD-Phase (trotz Verwendung einer chiralen Phase war eine Trennung der Enantiomere nicht möglich, dies stellte allerdings kein Problem dar, da ein Standard benötigt wurde, der beide Enantiomere enthält). Die Isolierung erfolgte bei 110°C isotherm. Ein Teil des isolierten Germacren D wurde in  $\text{CDCl}_3$  aufgenommen und NMR-spektroskopisch analysiert. Der restliche Teil wurde in Hexan p.a. aufgenommen und als GC-Standard verwendet.

Das Enantiomerenverhältnis von isoliertem Germacren D wurde per Kapillargaschromatographie an einer 6T-2,3-Me- $\beta$ -CD-Phase bestimmt, da für diese Phase die Elutionsreihenfolge der Enantiomere bekannt war<sup>[30]</sup>. Je nach verwendetem Pflanzenmaterial wurden Enantiomerenverhältnisse gemessen von (+)/(-)-Germacren D = 3:1 bis 1:9.

$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (in ppm)<sup>[58,30]</sup> =

0.81 (3H, d,  $^3J = 6.9$  Hz, 12- $\text{CH}_3$  oder 13- $\text{CH}_3$ ); 0.86 (3H, d,  $^3J = 6.9$  Hz, 12- $\text{CH}_3$  oder 13- $\text{CH}_3$ ); 1.44 (1H, m, H11); 1.45 (2H, m, 8- $\text{CH}_2$ ); 1.51 (3H, s, 14- $\text{CH}_3$ ); 2.08 (1H, m, H2), 2.10 (1H, m, H3), 2.2 (1H, m, H7); 2.27 (2H, m, 9- $\text{CH}_2$ ); 2.34 (2H, m, H2 und H3). 4.74 (1H, dd,  $^3J = 11.5$  Hz und 1 Hz, H15); 4.79 (1H, dd,  $^3J = 11.5$  Hz und 1 Hz, H15); 5.14 (1H, dd,  $^3J = 10.1$  Hz und 2 Hz, H1); 5.24 (1H, dd,  $^3J = 15.4$  Hz und 9.9 Hz, H6); 5.78 (1H, d,  $^3J = 15.4$  Hz, H5).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (in ppm)<sup>[58,30]</sup> =

15.9 (C14); 19.3 (C12 oder C13); 20.8 (C12 oder C13); 26.6 (C8); 29.2 (C2); 32.7 (C11); 34.5 (C3); 40.7 (C9); 52.9 (C7); 109.0 (C15); 129.7 (C1); 133.5 (C6); 134.0 (C4 oder C10); 135.5 (C5); 148.9 (C4 oder C10).

### 7.2.2 (*E,E*)-Farnesal (2)<sup>[126]</sup>

Unter einer Stickstoffatmosphäre wurden 500 mg (2.25 mmol) (*E,E*)-Farnesol in 20 mL wasserfreiem Dichlormethan gelöst. Die Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und unter Rühren wurden 5.5 g (62.9 mmol) Mangan(IV)-oxid (aktiviert) hinzugefügt. Die Suspension wurde auf RT erwärmt und 3 h gerührt. Die Reaktionsmischung wurde so-

dann durch Celite filtriert, mit 100 mL Dichlormethan nachgewaschen und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

Die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels Flash-Kieselgel-Chromatographie (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 15:1).

**Ausbeute:** 486 mg (2.21 mmol; 98 % d.Th.) einer klaren Flüssigkeit.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.49 (Petrolether/Ethylacetat 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

1.60 (3H, s, 12-CH<sub>3</sub> oder 13-CH<sub>3</sub>); 1.62 (3H, s, 12-CH<sub>3</sub> oder 13-CH<sub>3</sub>); 1.66 (3H, s, 14-CH<sub>3</sub>); 2.0 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>); 2.1 (3H, s, 15-CH<sub>3</sub>); 2.15 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>); 5.08 (2H, m, H<sub>6</sub> und H<sub>10</sub>); 5.86 (1H, d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, H<sub>2</sub>); 9.93 (1H, d, <sup>3</sup>J = 7 Hz, H<sub>1</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

16.9; 18.4; 18.5; 26.46; 26.47; 27.4; 40.4; 41.4; 123.2; 124.9; 128.2; 132.3; 137.4; 164.7; 191.9 (C<sub>1</sub>).

### 7.2.3 (*E,E*)-(1*R*)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesol (**3**)<sup>[9]</sup>

23 mg (105 μmol) Farnesal (**2**) wurden mit einem Tropfen Tween 20 in 20 mL Kaliumphosphat-Puffer (60 mM, pH 7.2) suspendiert (heftiges Rühren für 5 h). Zu der Suspension wurden unter schwachem Rühren 3.8 mg (5.7 μmol) NAD<sup>+</sup>, 10 mg (101 μmol) [1-<sup>2</sup>H]-Cyclohex-2-en-1-ol (**5**) und 17.0 mg (34 units) HLADH gegeben. Der Ansatz wurde im Dunklen ohne Rühren 2 d inkubiert.

Der Ansatz wurde dreimal mit je 50 mL Petrolether/Diethylether 1:1 extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Abschließend wurden die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

Das Rohprodukt wurde per Flash-Kieselgel-Chromatographie (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 7:1) aufgereinigt.

**Ausbeute:** 11.6 mg (53 μmol; 51% d.Th.) einer klaren Flüssigkeit mit einem Deuterierungsgrad von 90%.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.32 (Petrolether/Ethylacetat 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

1.53 (6H, s, 12-CH<sub>3</sub> und 13-CH<sub>3</sub>); 1.60 (6H, s, 14-CH<sub>3</sub> und 15-CH<sub>3</sub>); 1.8 – 2.2 (m, 8H, 4 x CH<sub>2</sub>); 4.05 (1.1H, d, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, H<sub>1</sub>); 5.04 (2H, m, H<sub>6</sub> und H<sub>10</sub>); 5.34 (1H, d, <sup>3</sup>J = 6.8 Hz, H<sub>2</sub>).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (in ppm) =

1.60 (6H, s, 12-CH<sub>3</sub> und 13-CH<sub>3</sub>); 1.67 (6H, s, 14-CH<sub>3</sub> und 15-CH<sub>3</sub>); 1.9 – 2.1 (m, 8H, 4 x CH<sub>2</sub>); 4.08 (1.1H, m, H<sub>1</sub>); 5.11 (2H, m, H<sub>6</sub> und H<sub>10</sub>); 5.36 (1H, m, H<sub>2</sub>).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

16.8; 17.0; 18.5; 26.5; 27.1; 27.5; 40.3; 40.5; 59.8 (t, <sup>2</sup>J = 21.8 Hz, C<sub>1</sub>) 124.0; 124.5; 125.1; 132.1; 136.1; 140.7.

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (in ppm) = 16.1; 16.3; 17.8; 25.9; 27.4; 27.8; 40.7; 40.9; 125.0; 125.2; 125.4; 132.1; 136.2; 139.4; (C1 nicht detektierbar).

**MS** (EI, 70 eV)  $m/z$  (%):

223 (1) [ $\text{M}^+$ ], 205 (1), 191 (2), 152 (3), 136 (10), 123 (8), 108 (8), 95 (10), 81 (28), 69 (100), 55 (10), 41 (42).

#### 7.2.4 Bis-(triethylammonium)-*ortho*-phosphat<sup>[118]</sup>

11.7 mL (173 mmol) 85%ige Phosphorsäure wurden unter Rühren in 100 mL Acetonitril (p.a.) gelöst und mit 47.9 mL (346 mmol) Triethylamin versetzt. Die Lösung wurde für 24 h bei  $-20^\circ\text{C}$  belassen, so daß das Produkt auskristallisierte. Das Produkt wurde abfiltriert und im Vakuum über NaOH getrocknet.

**Ausbeute:** 42.0 g (141 mmol; 82% d.Th.) weiße nadelförmige Kristalle.

**Schmelzpunkt:** 105 - 110°C (Literatur: 105 - 107°C).

#### 7.2.5 (*E,E*)-(1*R*)-[1- $^2\text{H}$ ]-Farnesyldiphosphat (**4**)<sup>[9,118,126]</sup>

Unter Stickstoffatmosphäre und Rühren wurden bei  $40^\circ\text{C}$  540 mg (1.82 mmol) Bis-(triethylammonium)-*ortho*-phosphat in 10 mL Acetonitril abs. gelöst. Nachdem sich das Salz vollständig gelöst hatte, wurde die Lösung auf RT abgekühlt. Die Phosphatlösung wurde über 2 h bei RT unter Stickstoffatmosphäre und Rühren zu einer Lösung von 134 mg (0.60 mmol) (*E,E*)-(1*R*)-[1- $^2\text{H}$ ]-Farnesol (**3**) in 540  $\mu\text{L}$  (2.18 mmol) Trichloracetonitril getropft. Die Lösung wurde für weitere 20 h bei RT gerührt.

Am Rotationsverdampfer wurde das Lösungsmittel bei  $40^\circ\text{C}$  abdestilliert. Es blieb eine Mischung aus den Mono-, Di- und Triphosphaten von (**3**) übrig. Die Mischung wurde nach zwei verschiedenen Methoden aufgereinigt:

a) Die Rohprodukt-Mischung wurde in 1.6 mL 25 mM wäßriger  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3/\text{CH}_3\text{CN}$  1:1 gelöst und in 100  $\mu\text{L}$  Portionen über eine präparative RP-18-Phase an einer HPLC-Anlage getrennt. Laufmittel war ebenfalls eine 25 mM wäßrige  $(\text{NH}_4)\text{HCO}_3/\text{CH}_3\text{CN}$  1:1 Lösung (Flow: 7 mL  $\text{min}^{-1}$ ). Vorversuche an einer analytischen RP-18-Phase mit 10  $\mu\text{L}$  Probenvolumen und einem Flow von 1 mL  $\text{min}^{-1}$  zeigten, daß Gradientenprogramme mit variierenden Salzkonzentrationen keine besseren Trennungen ergeben. Trotz Verwendung eines UV-Meters (214 nm) war eine Produktdetektion auf diesem Wege nicht möglich. Das Eluat wurde daher fraktioniert aufgefangen und die Diphosphat-Fraktion mittels Dünnschicht-Chromatographie ermittelt.

b) Die Rohprodukt-Mischung wurde über eine Dowex 1-8 (200 – 400 mesh, Aldrich) Anionenaustauscher Säule in der Formiat-Form (25 g) gereinigt. Die Phosphate wurden

mit einem Salzgradienten von 0.053 M – 0.43 M Ammoniumformiat in Methanol eluiert und fraktioniert aufgefangen. Die Diphosphat-Fraktion wurde durch Dünnschicht-Chromatographie ermittelt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

Das Rohprodukt aus den Methoden *a*) und *b*) wurde in 20 mL 0.01 M Ammoniak-Lösung aufgenommen und mit 25 g XAD-2 Kunstharz für 4 h schwach gerührt. Nachdem FDP an das Kunstharz gebunden war, wurde die Flüssigkeit abdekantiert und das Kunstharz fünfmal mit je 40 mL 0.01 M Ammoniak-Lösung gewaschen. Sodann wurde das FDP durch viermaliges Spülen mit je 30 mL 0.01 M Ammoniak-Lösung in Methanol vom Kunstharz abgelöst. Die vereinigten Methanol-Phasen wurden am Rotationsverdampfer eingengt und Lösungsmittelreste im Hochvakuum entfernt. Abschließend wurde das Produkt lyophilisiert. Nach der Aufreinigung lag das Produkt in der „Tri-Ammonium-Salz-Form“ vor.

Die Reinheit der Verbindung wurde mit Hilfe der NMR-Spektroskopie bestimmt. Da weder im  $^1\text{H-NMR}$ - noch im  $^{31}\text{P-NMR}$ -Spektrum Signale von Verunreinigungen detektiert wurden, konnte von einer Reinheit > 95% ausgegangen werden.

**Ausbeute:** Methode *a*): 10.5 mg (0.024 mmol; 4.1% d.Th.); Methode *b*): 36.8 mg (0.09 mmol; 15% d.Th.; Literaturwerte schwanken zwischen 10% und 20% Ausbeute d.Th.). Der Deuterierungsgrad betrug jeweils 90%. In Anbetracht der niedrigeren Ausbeute wurde für weitere FDP-Synthesen ausschließlich der Weg über Methode *b*) gewählt. Die Wahl fiel umso leichter in Anbetracht der Tatsache, daß Methode *b*) ohne die kostenintensiven „HPLC-grade“-Lösungsmittel betrieben werden konnte.

**R<sub>f</sub>-Werte:** Monophosphat: 0.50; Diphosphat: 0.35; Triphosphat: 0.28 (Pr<sup>n</sup>OH/Bu<sup>n</sup>OH/2 M NH<sub>3</sub> 5:2:3).

**$^1\text{H-NMR}$**  (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (in ppm) =  
1.58 (6H, s, 12-CH<sub>3</sub> und 13-CH<sub>3</sub>); 1.66 (3H, s, 14-CH<sub>3</sub> oder 15-CH<sub>3</sub>); 1.70 (3H, s, 14-CH<sub>3</sub> oder 15-CH<sub>3</sub>); 1.9 – 2.1 (m, 8H, 4 x CH<sub>2</sub>); 4.50 (1.1H, m, H1); 5.09 (2H, m, H6 und H10); 5.42 (1H, m, H2).

**$^{13}\text{C-NMR}$**  (100.6 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (in ppm) =  
16.1; 16.6; 17.8; 25.9; 27.5; 27.9; 40.7; 40.9; 122.5; 125.4; 125.5; 132.1; 135.8; 140.6;  
(C1 nicht detektierbar).

**$^{31}\text{P-NMR}$**  (81 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  (in ppm) =  
-6.4; -9.7 (jeweils breite Signale).

## 7.2.6 [ $^{2}\text{H}$ ]-Cyclohex-2-en-1-ol (5) <sup>[9]</sup>

100 mg (1.04 mmol) Cyclohex-2-en-1-ol wurden unter Rühren bei RT in 2.6 mL Methanol gelöst und mit 388 mg (1.0 mmol) Cer-(III)-chlorid · 7 H<sub>2</sub>O versetzt. Die Lösung wurde auf 0°C abgekühlt und 26.68 mg (0.64 mmol) Natriumbordeuterid hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde für weitere 3 h bei RT gerührt und abschließend mit 10 mL

H<sub>2</sub>O versetzt. Der Ansatz wurde dreimal mit je 10 mL Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert und das Rohprodukt mittels Flash-Kieselgel-Chromatographie (Laufmittel Petrolether/Ethylacetat 5:1) aufgereinigt.

**Ausbeute:** 70 mg (70 mmol; 68 d.Th.) einer gelblichen Flüssigkeit mit einem Deuterierungsgrad von 97%.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.14 (Petrolether/Ethylacetat 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

1.5 – 2.1 (6H, m, 3 x CH<sub>2</sub>); 5.73 (1H, d, <sup>3</sup>J = 10.1 Hz, H2); 5.80 (1H, dt, <sup>3</sup>J = 10.1 Hz und 3.5 Hz, H3).

**<sup>13</sup>C-NMR** (125.8 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

18.8; 24.8; 31.6; 64.6 (t, <sup>2</sup>J = 18 Hz, C1); 129.8; 129.9.

### 7.2.7 (*E,E*)-(IRS)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesol (7) <sup>[9]</sup>

100 mg (0.46 mmol) (*E,E*)-Farnesal (2) wurden unter Stickstoffatmosphäre und Rühren in 12 mL CH<sub>3</sub>OD (abs.) gelöst und 8 mg (0.18 mmol) NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub> hinzugefügt. Nach zweistündigem Rühren wurde die Lösung mit 20 mL ges. NaCl-Lösung versetzt und dreimal mit je 30 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

Das Rohprodukt wurde per Flash-Kieselgel-Chromatographie (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 7:1) aufgereinigt.

**Ausbeute:** 89 mg (0.40 mmol; 87% d.Th.) einer klaren Flüssigkeit mit einem Deuterierungsgrad von 98%.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.32 (Petrolether/Ethylacetat 5:1).

Die spektroskopischen Daten sind mit denen von (*E,E*)-(IR)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesol (3) identisch.

### 7.2.8 (*E,E*)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesal (8) <sup>[9]</sup>

50 mg (0.23 mmol) (*E,E*)-(IRS)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesol (7) wurden unter Stickstoffatmosphäre und Rühren in 10 mL Dichlormethan (abs.) gelöst und auf 0°C abgekühlt. Der Lösung wurden unter Rühren 550 mg (6.3 mmol) MnO<sub>2</sub> (aktiviert) hinzugefügt und auf RT erwärmt. Die Suspension wurde für weitere 3 h gerührt. Der Ansatz wurde durch Celite filtriert und mit 100 mL Dichlormethan nachgewaschen.

Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert und die Reinigung des Rohproduktes erfolgte mittels Flash-Kieselgel-Chromatographie (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 15:1).

**Ausbeute:** 42.7 mg (0.19 mmol; 84 % d.Th.) einer klaren Flüssigkeit mit einem Deuterierungsgrad von 96%.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.49 (Petrolether/Ethylacetat 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

1.59 (3H, s, 12-CH<sub>3</sub> oder 13-CH<sub>3</sub>); 1.60 (3H, s, 12-CH<sub>3</sub> oder 13-CH<sub>3</sub>); 1.67 (3H, s, 14-CH<sub>3</sub>); 2.0 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>); 2.1 (3H, s, 15-CH<sub>3</sub>); 2.15 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>); 5.08 (2H, m, H6 und H10); 5.88 (1H, bs, H2); 9.99 (0.04H, d, <sup>3</sup>J = 7.9 Hz, H1).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

16.8; 18.4; 18.5; 26.4; 26.5; 27.4; 40.4; 41.4; 123.2; 124.9; 128.2; 132.3; 137.3; 164.7; 191.9 (t, <sup>2</sup>J = 24.3 Hz, C1).

### 7.2.9 (*E,E*)-(1*S*)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesol (**9**)<sup>[9]</sup>

100 mg (0.45 mmol) (*E,E*)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesal (**8**) wurden unter Rühren in 1 mL Dioxan gelöst und in 30 mL Inkubationspuffer (100 mM Glycin, pH 8.8) überführt und dort unter heftigen Rühren suspendiert (5 h). Unter schwachen Rühren wurden 5 mg (10 units) HLADH, 50 mg (70 μmol) NADH und 1 mL Ethanol (p.a.) hinzugefügt und abschließend für 4 d im Dunkeln ohne Rühren inkubiert.

Die Mischung wurde mit 20 mL ges. NaCl-Lösung versetzt und dreimal mit je 50 mL Diethylether/Petrolether 1:1 extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

Das Rohprodukt wurde per Flash-Kieselgel-Chromatographie (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 7:1) aufgereinigt.

**Ausbeute:** 42.6 mg (0.19 mmol; 42% d.Th.) einer klaren Flüssigkeit mit einem Deuterierungsgrad von 91%.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.32 (Petrolether/Ethylacetat 5:1).

Die spektroskopischen Daten sind mit denen von (*E,E*)-(1*R*)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesol (**3**) identisch.

### 7.2.10 (*E,E*)-(1*S*)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesyldiphosphat (**10**)<sup>[9,126]</sup>

100 mg (0.45 mmol) (*E,E*)-(1*S*)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesol (**9**) wurden auf dem gleichen Wege phosphoryliert, wie für (*E,E*)-(1*R*)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesyldiphosphat (**4**) beschrieben. Für die Aufreinigung wurde ebenfalls Methode *b*) verwendet.

**Ausbeute:** 23.6 mg (0.054 mmol; 12% d.Th.) eines weißen Feststoffs mit einem Deuterierungsgrad von 90%.

Die spektroskopischen Daten sind mit denen von (*E,E*)-(1*R*)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesyldiphosphat (**4**) identisch.

### 7.2.11 (*E,E*)-[1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Farnesol (**11**)<sup>[9]</sup>

100 mg (0.45 mmol) (*E,E*)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesal (**8**) wurden unter Stickstoffatmosphäre und Rühren in 12 mL CH<sub>3</sub>OD (abs.) gelöst und 20 mg (0.45 mmol) Natriumborodeuterid hin-

zugefügt. Nach zweistündigem Rühren wurde die Lösung mit 20 mL ges. NaCl-Lösung versetzt und dreimal mit je 30 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Kieselgel-Chromatographie (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 7:1) aufgereinigt.

**Ausbeute:** 92 mg (0.41 mmol; 91% d.Th.) einer klaren Flüssigkeit mit einem Deuterierungsgrad von 91%.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.32 (Petrolether/Ethylacetat 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

1.60 (6H, s, 12-CH<sub>3</sub> und 13-CH<sub>3</sub>); 1.68 (6H, s, 14-CH<sub>3</sub> und 15-CH<sub>3</sub>); 1.8 – 2.2 (m, 8H, 4 x CH<sub>2</sub>); 4.05 (0.09H, m, H1); 5.08 (2H, m, H6 und H10); 5.41 (1H, s, H2).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

16.8; 17.0; 18.5; 26.5; 27.1; 27.5; 40.3; 40.5; 59.5 (quint., <sup>2</sup>J 18.0 Hz, C1); 123.9; 124.6; 125.1; 132.1; 136.1; 140.7.

**MS** (EI, 70 eV) *m/z* (%):

224 (1) [M<sup>+</sup>], 206 (1), 191 (2), 163 (2), 152 (2), 136 (8), 121 (8), 109 (9), 95 (15), 81 (29), 69 (100), 53 (8), 41 (40).

### 7.2.12 (*E,E*)-[1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Farnesyldiphosphat (**12**)<sup>[9,126]</sup>

92 mg (0.41 mmol) (*E,E*)-[1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]-Farnesol (**11**) wurden auf dem gleichen Wege phosphoryliert, wie für (*E,E*)-(*1R*)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesyldiphosphat (**4**) beschrieben. Für die Aufreinigung wurde ebenfalls Methode *b*) verwendet.

**Ausbeute:** 34.1 mg (0.078 mmol; 19% d.Th.) eines weißen Feststoffs mit einem Deuterierungsgrad von 90%.

**R<sub>f</sub>-Werte:** Monophosphat: 0.50; Diphosphat: 0.35; Triphosphat: 0.28 (Pr<sup>n</sup>OH/Bu<sup>n</sup>OH/2 M NH<sub>3</sub> 5:2:3).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (in ppm) =

1.60 (6H, s, 12-CH<sub>3</sub> und 13-CH<sub>3</sub>); 1.67 (3H, s, 14-CH<sub>3</sub> oder 15-CH<sub>3</sub>); 1.70 (3H, s, 14-CH<sub>3</sub> oder 15-CH<sub>3</sub>); 1.9 – 2.1 (m, 8H, 4 x CH<sub>2</sub>); 4.52 (0.1H, m, H1); 5.10 (2H, m, H6 und H10); 5.43 (1H, s, H2).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100.6 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (in ppm) =

16.1; 16.6; 17.8; 25.9; 27.5; 27.8; 40.7; 40.9; 122.5; 125.3; 125.4; 132.1; 136.1; 140.6; (C1 nicht detektierbar).

**<sup>31</sup>P-NMR** (81 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (in ppm) =

-6.4; -9.7 (jeweils breite Signale).

**7.2.13 (*E,E*)-Farnesylacetat (13)** <sup>[126]</sup>

935 mg (4.2 mmol) (*E,E*)-Farnesol wurden in 12 mL Pyridin (abs.) unter Stickstoffatmosphäre und Rühren bei RT gelöst, mit 12 ml frisch destillierten Acetanhydrid versetzt und für 20 h gerührt. Der Ansatz wurde in 150 mL Eiswasser gegeben und die wäßrige Phase dreimal mit je 50 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden nacheinander je zweimal mit jeweils 50 mL 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, kaltem Wasser, ges. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

Das Produkt wurde im Hochvakuum von Lösungsmittelresten befreit und zeigte in einer gaschromatographischen Analyse eine Reinheit von 99%, so daß eine weitere Reinigung nicht nötig war.

**Ausbeute:** 1.06 g (4.0 mmol; 95% d.Th.) einer klaren Flüssigkeit.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.70 (Petrolether/Ethylacetat 5:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

1.59 (6H, s, 12-CH<sub>3</sub> und 13-CH<sub>3</sub>); 1.67 (3H, s, 14-CH<sub>3</sub> oder 15-CH<sub>3</sub>); 1.70 (3H, s, 14-CH<sub>3</sub> oder 15-CH<sub>3</sub>); 2.04 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO); 1.9 – 2.1 (8H, m, 4 x CH<sub>2</sub>); 4.50 (2H, d, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, H1); 5.09 (2H, m, H6 und H10); 5.34 (1H, dt, <sup>3</sup>J = 1.2 Hz und 7.1 Hz).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

16.8; 17.2; 18.4; 21.8; 26.5; 27.0; 27.5; 40.3; 40.5; 62.2; 119.0; 124.4; 125.1; 132.1; 136.2; 143.0; 171.9.

**7.2.14 (*E,E*)-10,11-Epoxy-farnesylacetat (14)** <sup>[126]</sup>

800 mg (3.024 mmol) (*E,E*)-Farnesylacetat (13) wurden bei 0°C in 30 mL Dichlormethan (p.a.) gelöst und portionsweise unter Rühren mit 733 mg (85%, 3.64 mmol) *meta*-Chlorperbenzoesäure versetzt. Nach 3 h Rühren wurde die Lösung mit 100 mL 10% Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung versetzt und die organische Phase abgetrennt. Die wäßrige Phase wurde dreimal mit je 50 mL Diethylether extrahiert und die vereinigten organischen Phasen wurden jeweils zweimal mit je 50 mL ges. Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>-Lösung, ges. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Kieselgel-Chromatographie (Laufmittel Petrolether/Ethylacetat 10:1) gereinigt, dabei wurde eine Mischung von Mono-Epoxiden erhalten.

**Ausbeute:** 508 mg (1.814 mmol; 60% d.Th.) einer leicht gelblichen Flüssigkeit die laut GC aus einer 2:1 Mischung von 10,11-Epoxy-farnesylacetat und 6,7-Epoxy-farnesylacetat bestand. Eine weitere Aufreinigung an dieser Stelle war nicht nötig, da die Mischung direkt in der Folgereaktion eingesetzt wurde.

**R<sub>f</sub>-Werte:** Mono-Epoxid-Gemisch: 0.55; Di-Epoxid-Gemisch: 0.24 (Hexan/Diethylether 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** der Mischung, eine eindeutige Zuordnung aller Signale ist nicht möglich (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

1.25, 1.26, 1.30, 1.60, 1.61, 1.68, 1.69, 1.72 (diverse Singulets der verschiedenen Methylgruppen in beiden Mono-Epoxiden); 2.03 (s, CH<sub>3</sub>CO); 2.0 – 2.2 (m, diverse CH<sub>2</sub> der Mono-Epoxide); 2.70 (t, <sup>3</sup>J = 6.1 Hz, Protonen an den Epoxid-Funktionen); 4.58 (m, H1); 5.11 (m, H6 und H10); 5.36 (m, H2).

**<sup>13</sup>C-NMR** der Mischung (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

16.8; 17.2; 17.3; 18.4; 19.5; 21.8; 24.6; 25.7; 26.4; 26.9; 27.7; 28.2; 36.9; 37.1; 39.5; 40.2; 59.1; 61.6; 62.0; 62.1; 63.8; 64.9; 119.1; 119.6; 124.4; 125.0; 132.6; 135.4; 142.0; 142.8; 171.9.

### 7.2.15 (*E,E*)-10,11-Dihydroxy-farnesylacetat (**15**)<sup>[126]</sup>

420 mg (1.5 mmol) einer 2:1 Mischung von (*E,E*)-10,11-Epoxy-farnesylacetat (**14**) und (*E,E*)-6,7-Epoxy-farnesylacetat wurden unter Rühren bei RT in 20 mL THF/H<sub>2</sub>O 1:1 gelöst und mit 1 mL 3% HClO<sub>4</sub>-Lösung versetzt. Der Ansatz wurde 4 h bei RT gerührt und die Reaktion durch Zugabe von 10 mL ges. NaCl-Lösung gestoppt. Die wäßrige Phase wurde dreimal mit je 30 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden jeweils zweimal mit je 40 mL ges. K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

Das Rohprodukt wurde über Flash-Kieselgel-Chromatographie (Laufmittelgradient: Petrolether/Ethylacetat 5:1 → 2:1) aufgereinigt.

**Ausbeute:** 220 mg (0.74 mmol; 49% d.Th.) einer farblosen Flüssigkeit.

**R<sub>f</sub>-Werte:** (*E,E*)-10,11-Dihydroxy-Farnesylacetat: 0.38; (*E,E*)-6,7-Dihydroxy-Farnesylacetat: 0.52 (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Diethylether 1:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

1.15 (3H, s, 12-CH<sub>3</sub> oder 13-CH<sub>3</sub>); 1.19 (3H, s, 12-CH<sub>3</sub> oder 13-CH<sub>3</sub>); 1.60 (3H, s, 14-CH<sub>3</sub> oder 15-CH<sub>3</sub>); 1.69 (3H, s, 14-CH<sub>3</sub> oder 15-CH<sub>3</sub>); 2.01 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO); 1.5 – 2.4 (8H, m, 4 x CH<sub>2</sub>); 3.33 (1H, m, H10); 4.58 (2H, d, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, H1); 5.15 (1H, t, <sup>3</sup>J = 6.6 Hz, H6); 5.32 (1H, t, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, H2).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

16.7; 17.1; 21.8; 24.0; 26.7; 27.2; 30.3; 37.4; 40.1; 62.2; 73.7; 78.8; 119.3; 125.1; 136.1; 142.7; 172.0.

### 7.2.16 Farnesylacetatrinoraldehyd (**16**)<sup>[126]</sup>

170 mg (0.57 mmol) (*E,E*)-10,11-Dihydroxy-farnesylacetat (**15**) wurden unter Rühren bei RT in 15 mL THF/H<sub>2</sub>O 1:1 gelöst, portionsweise mit 150 mg (0.70 mmol) Natrium-*meta*-periodat versetzt und für weitere 3 h bei RT gerührt. Der Ansatz wurde mit 15 mL ges. NaCl-Lösung versetzt und die wäßrige Phase dreimal mit je 30 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden jeweils zweimal mit je 30 mL H<sub>2</sub>O und ges. NaCl-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Kieselgel-Chromatographie (Petrolether/Ethylacetat 4:1) gereinigt.

**Ausbeute:** 131.8 mg (0.55 mmol; 96% d.Th.) einer farblosen Flüssigkeit.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.32 (Hexan/Diethylether 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR**, beachte Nummerierung der Atome in Abb. 79, Seite 90 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
δ (in ppm) =

1.60 (3H, s, 11-CH<sub>3</sub> oder 12-CH<sub>3</sub>); 1.69 (3H, s, 11-CH<sub>3</sub> oder 12-CH<sub>3</sub>); 2.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO); 2.0 – 2.1 (4H, m, 2 x CH<sub>2</sub>); 2.31 (2H, t, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz, 8-CH<sub>2</sub>); 2.50 (2H, dt, <sup>3</sup>J = 7.8 Hz und 1.9 Hz, 9-CH<sub>2</sub>); 4.57 (2H, d, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, H1); 5.12 (1H, m, H6); 5.32 (1H, t, <sup>3</sup>J = 7.1, H2); 9.74 (1H, t, <sup>3</sup>J = 1.9 Hz, H10).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

15.7; 16.0; 20.6; 25.6; 31.4; 38.8; 41.7; 60.9; 118.1; 124.3; 133.0; 141.4; 170.7; 202.2.

### 7.2.17 (*IRS*)-[1-<sup>2</sup>H]-10-Acetoxy-4,8-dimethyldeca-4,8-dien-1-ol (**17**)<sup>[9]</sup>

131 mg (0.55 mmol) Farnesylacetatrinoraldehyd (**16**) wurden unter Rühren und Stickstoffatmosphäre in 10 mL CH<sub>3</sub>OD gelöst und bei 0°C mit 14 mg (360 μmol) NaB<sup>2</sup>H<sub>4</sub> versetzt. Nach 10 min wurde die Lösung mit 5 mL 1M HCl-Lösung und 5 mL ges. NaCl-Lösung versetzt und dreimal mit je 15 mL Diethylether extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

Das Rohprodukt wurde mittels Flash-Kieselgel-Chromatographie (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 2:1) gereinigt.

**Ausbeute:** 85 mg (0.35 mmol; 64% d.Th.) einer farblosen Flüssigkeit mit einem Deuterierungsgrad von 98%.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.21 (Petrolether/Ethylacetat 2:1).

**<sup>1</sup>H-NMR**, beachte Nummerierung der Atome in Abb. 79, Seite 90 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  
δ (in ppm) =

1.60 (3H, s, 11-CH<sub>3</sub> oder 12-CH<sub>3</sub>); 1.65 (2H, dt, <sup>3</sup>J = 6.9 Hz und 7.2 Hz, H2); 1.69 (3H, s, 11-CH<sub>3</sub> oder 12-CH<sub>3</sub>); 2.0 – 2.2 (6H, m, 3 x CH<sub>2</sub>); 2.05 (3H, s, CH<sub>3</sub>CO); 3.59 (1.02H, t, <sup>3</sup>J

= 6.9 Hz, H1); 4.58 (2H, d,  $^3J = 7.1$  Hz, H10); 5.12 (1H, t,  $^3J = 6.9$  Hz, H5); 5.33 (1H, t,  $^3J = 7.1$  Hz, H9).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (in ppm) = 16.6; 17.1; 21.8; 26.8; 31.3; 36.6; 40.2; 62.2; 63.1 (t,  $^2J = 21.5$  Hz, C1); 119.2; 124.9; 135.9; 142.7; 171.9.

### 7.2.18[10- $^2\text{H}$ ]-Farnesylacetatrinoraldehyd (**18**)<sup>[9]</sup>

77.6 mg (0.32 mmol) (*1RS*)-[1- $^2\text{H}$ ]-10-Acetoxy-4,8-dimethyldeca-4,8-dien-1-ol (**17**) wurden unter Rühren und Stickstoffatmosphäre in 10 mL Dichlormethan (abs.) gelöst und mit 730 mg (1.94 mmol) Pyridiniumdichromat versetzt. Die Suspension wurde für 20 h bei RT gerührt. Der Reaktionsansatz wurde sodann über Celite filtriert und mit 100 mL Diethylether nachgewaschen. Die vereinigten organischen Phasen wurden über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

Das Rohprodukt wurde per Flash-Kieselgel-Chromatographie (Laufmittelgradient: Petrolether/Ethylacetat 5:1  $\rightarrow$  1:1) aufgereinigt.

**Ausbeute:** 43 mg (0.18 mmol; 56% d.Th.) einer farblosen Flüssigkeit mit einem Deuterierungsgrad von 91%.

**R<sub>f</sub>-Wert:** 0.32 (Hexan/Diethylether 2:1).

$^1\text{H-NMR}$ , beachte Nummerierung der Atome in Abb. 79, Seite 90 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (in ppm) =

1.60 (3H, s, 11- $\text{CH}_3$  oder 12- $\text{CH}_3$ ); 1.69 (3H, s, 11- $\text{CH}_3$  oder 12- $\text{CH}_3$ ); 2.05 (3H, s,  $\text{CH}_3\text{CO}$ ); 2.0 – 2.1 (4H, m, 2 x  $\text{CH}_2$ ); 2.31 (2H, t,  $^3J = 7.6$  Hz, 8- $\text{CH}_2$ ); 2.50 (2H, t,  $^3J = 7.6$ , 9- $\text{CH}_2$ ); 4.58 (2H, d,  $^3J = 7.1$  Hz, H1); 5.12 (1H, m, H6); 5.32 (1H, t,  $^3J = 7.1$ , H2); 9.74 (0.09H, t,  $^3J = 1.9$  Hz, H10).

$^{13}\text{C-NMR}$  (100.6 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (in ppm) = 16.9; 17.2; 21.8; 26.8; 32.5; 40.0; 42.7; 62.1; 119.3; 125.5; 134.2; 142.6; 171.8; 203.0 (t,  $^2J = 26.0$  Hz, C10).

### 7.2.19(*E,E*)-[10- $^2\text{H}$ ]-Farnesol (**19**)<sup>[9]</sup>

79 mg (213  $\mu\text{mol}$ ) Ethyltriphenylphosphoniumbromid wurden unter Rühren und Stickstoffatmosphäre bei 0°C in 1 mL THF (abs.) gelöst, 137  $\mu\text{L}$  (213  $\mu\text{mol}$ ) einer 1.6 M Butyllithium-Lösung in Hexan hinzugegossen und für 1 h gerührt. Anschließend wurden 13.3  $\mu\text{L}$  Methyljodid (30.2 mg = 213  $\mu\text{mol}$ ) zugegossen und weitere 30 min gerührt. Nach erneuter Zugabe von 137  $\mu\text{L}$  (213  $\mu\text{mol}$ ) einer 1.6 M Butyllithium-Lösung in Hexan wurden bei 0°C 51 mg (0.21 mmol) [10- $^2\text{H}$ ]-Farnesylacetatrinoraldehyd (**18**) in 600  $\mu\text{L}$  THF (abs.) zugefügt und die Lösung langsam auf RT erwärmt. Nach 20 h Rühren wurde die Lösung mit 5 mL einer Mischung von MeOH/ges. NaCl/ $\text{H}_2\text{O}$  4:3:3 versetzt und die wäß-

rige Phase dreimal mit je 5 mL Pentan extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit je 10 mL der obengenannten MeOH/ges. NaCl/H<sub>2</sub>O-Lösung gewaschen, über Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abdestilliert.

Das Zwischenprodukt wird in 1 mL Methanol aufgenommen, mit 40 mg K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> versetzt und für 5 h bei RT gerührt. Das Lösungsmittel wurde am Rotationsverdampfer abdestilliert und das Rohprodukt sodann per Flash-Chromatographie an Kieselgel, das mit 10% Silbernitrat imprägniert war, gereinigt (Laufmittelgradient: Petrolether/Ethylacetat 8:1 → 5:1).

**Ausbeute:** 11.8 mg (53 μmol; 25% d.Th.) einer farblosen Flüssigkeit mit einem Deuterierungsgrad von 90%.

**R<sub>f</sub>-Wert** (AgNO<sub>3</sub> imprägnierte DC-Folie): (*E,E*)-Isomer: 0.20, (*2E,6Z*)-Isomer: 0.17 (Laufmittel: Petrolether/Ethylacetat 8:1).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

1.60 (3H, s, 12-CH<sub>3</sub> oder 13-CH<sub>3</sub>); 1.69 (3H, s, 12-CH<sub>3</sub> oder 13-CH<sub>3</sub>); 1.9 – 2.1 (8H, m, 4 x CH<sub>2</sub>); 4.05 (2H, d, <sup>3</sup>J = 7.1 Hz, H1); 5.11 (1.1H, m, H6 und undeuterierte Reste von H10); 5.42 (1H, t, <sup>3</sup>J = 7.1, H2).

**<sup>13</sup>C-NMR** (100.6 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (in ppm) =

16.8; 17.0; 18.4; 26.4; 27.1; 27.4; 40.3; 40.5; 60.2; 124.1; 124.5; 132.0; 136.1; 140.6; (C10 nicht detektierbar).

**MS** (EI, 70 eV) *m/z* (%):

223 (1) [M<sup>+</sup>], 205 (1), 192 (2), 180 (2), 162 (2), 161 (2), 136 (9), 124 (6) 107 (10), 93 (17), 81 (24), 70 (100), 55 (11), 41 (41).

### 7.2.20 (*E,E*)-[10-<sup>2</sup>H]-Farnesyldiphosphat (**20**)<sup>[9,126]</sup>

75 mg (0.34 mmol) (*E,E*)-[10-<sup>2</sup>H]-Farnesol (**19**) wurden auf dem gleichen Wege phosphoryliert, wie für (*E,E*)-(*IR*)-[1-<sup>2</sup>H]-Farnesyldiphosphat (**4**) beschrieben. Für die Aufreinigung wurde ebenfalls Methode *b*) verwendet.

**Ausbeute:** 16.3 mg (0.037 mmol; 11% d.Th.) eines weißen Feststoffs mit einem Deuterierungsgrad von 90%.

**R<sub>f</sub>-Werte:** Monophosphat: 0.50; Diphosphat: 0.35; Triphosphat: 0.28 (Pr<sup>n</sup>OH/Bu<sup>n</sup>OH/2 M NH<sub>3</sub> 5:2:3).

**<sup>1</sup>H-NMR** (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (in ppm) =

1.60 (6H, s, 12-CH<sub>3</sub> und 13-CH<sub>3</sub>); 1.67 (3H, s, 14-CH<sub>3</sub> oder 15-CH<sub>3</sub>); 1.70 (3H, s, 14-CH<sub>3</sub> oder 15-CH<sub>3</sub>); 1.9 – 2.1 (m, 8H, 4 x CH<sub>2</sub>); 4.50 (2H, m, H1); 5.10 (1.1H, m, H6 und undeuterierte Reste von H10); 5.43 (1H, m, H2).

**<sup>31</sup>P-NMR** (81 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (in ppm) =

-6.4; -9.7 (jeweils breite Signale).

## 7.3 Biochemischer Teil

Im folgenden Kapitel wird die Durchführung aller Experimente beschrieben, die der Isolierung und Charakterisierung der beschriebenen Synthasen dienen.

### 7.3.1 Verwendete Puffer

*Puffer A* (Extraktionspuffer): 25 mM Mopso, 25 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 25 mM Ascorbinsäure, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 20% (v/v) Glycerol, pH 7.0.

*Puffer B* (Puffer zur Regenerierung von DEAE): 150 mM Mopso, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, pH 7.0.

*Puffer C* (Säulenpuffer für DEAE): 15 mM Mopso, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 2 mM DTT, 10% (v/v) Glycerol, pH 7.0.

*Puffer D* (Cyclasenpuffer für DEAE): 15 mM Mopso, 1 mM Ascorbinsäure, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 10% (v/v) Glycerol, pH 7.0.

*Puffer E* (Cyclasenpuffer): 15 mM Mopso, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 10% (v/v) Glycerol, pH 7.0.

*Puffer F* (Puffer I für Hydroxylapatit-Chromatographie): 5 mM Kaliumphosphat, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 10% (v/v) Glycerol, pH 6.8.

*Puffer G* (Puffer II für Hydroxylapatit-Chromatographie): 400 mM Kaliumphosphat, 1 mM DTT, 20% (v/v) Glycerol, pH 6.8.

*Puffer H* (Puffer für MonoQ Chromatographie): 15 mM Mopso, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT, 10% (v/v) Glycerol, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7.0.

*Puffer I* (Kalibrierpuffer für Gelfiltration): 15 mM Mopso, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10% (v/v) Glycerol, pH 7.0.

*Puffer J* (Extraktionspuffer für Oxidationsexperiment): 100 mM Tris, 50 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, 50 mM Ascorbinsäure, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 5 μM FAD, 5 μM FMN, 2.5 mM EDTA, 20% (v/v) Glycerol, pH 7.5.

*Puffer K* (Assaypuffer für Oxidationsexperiment): 25 mM Tris, 1 mM Ascorbinsäure, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM Natrium-*meta*-vanadat, 2 mM DTT, 5 μM FAD, 5 μM FMN, 10% (v/v) Glycerol, pH 7.2.

### 7.3.2 Enzymrohextrakt

1.5 g PVPP wurden in einem Mörser bei 4°C mit 5 Spatelspitzen Seesand und 15 mL Puffer A (Extraktionspuffer) verrührt. Zu der Suspension wurden 15 g gefrorene Blätter von *Solidago canadensis* gefügt und solange gemörsert, bis eine homogene Masse entstand (ca. 20 min). Während des Mörserns wurden sukzessive weitere 35 mL Puffer A hinzugefügt. Abschließend wurden 7.5 g XAD-4 hinzugefügt und vorsichtig für 10 min gerührt (nicht mörsern). Die Masse wurde durch Cheesecloth filtriert und das Filtrat für

20 min bei 20.000g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde durch Glaswolle filtriert und das Filtrat für 90 min bei 100.000g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde erneut durch Glaswolle filtriert und stand dann weiteren Aufreinigungen zur Verfügung (Enzymrohextrakt).

### 7.3.3 DEAE-Anionenaustauscher-Chromatographie

25g DEAE (DE-52) wurden mit 100 mL Puffer B verrührt (Glasstab). Nach 15 min wurde der Überstand abdekantiert. Der Ionentauscher wurde erneut mit 100 mL Puffer B versetzt und der pH-Wert der Suspension auf pH 7.0 eingestellt. Nach erneuter Abdekantierung des Überstandes wurde der Ionenaustauscher mit 100 mL Puffer C in eine 15 x 2.5 cm Säule überführt und für 90 min bei einem Flow von 1.5 mL min<sup>-1</sup> mit Puffer C gespült.

Auf die DEAE-Säule wurden 50 mL des Enzymrohextraktes geladen (Flow: 1.5 mL min<sup>-1</sup>). Anschließend wurde die Säule für weitere 30 min mit Puffer C gespült, um nicht gebundene Proteine des Rohextraktes zu entfernen. Danach wurden gebundene Proteine durch einen Gradienten von 0.0 – 0.5 M KCl in Puffer C (linearer Gradient über 1 h) eluiert. Das Eluat wurde in 2.5 mL Portionen fraktioniert aufgefangen. 20 µL Äquivalente jeder Fraktion wurden in Microassays auf Synthase-Aktivität untersucht, aktive Fraktionen gepoolt und in Puffer D entsalzt. Die entsalzte DEAE-Fraktion wurde mit Glycerol versetzt bis eine Konzentration von 20% (v/v) Glycerol erreicht war. Die DEAE-Fraktion wurde in 1.5 mL Eppendorf-Vials überführt, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei –80°C gelagert.

### 7.3.4 AMS-Präzipitation

25g DEAE (DE-52) wurden mit 100 mL Puffer B verrührt (Glasstab). Nach 15 min wurde der Überstand abdekantiert. Der Ionentauscher wurde erneut mit 100 mL Puffer B versetzt und der pH-Wert der Suspension auf pH 7.0 eingestellt. Nach erneuter Abdekantierung des Überstandes wurde der Ionenaustauscher mit 100 mL Puffer C versetzt. Der Ionentauscher wurde insgesamt sechsmal mit Puffer C gewaschen. Danach wurde der Ionentauscher mit 50 mL Enzymrohextrakt versetzt und für 5 min bei 4°C umgeschwenkt. Nach Absinken des Ionentauschers, wurde der Überstand abdekantiert (DEAE-Überstand, entspricht dem „DEAE-Durchlauf“ der in Kapitel 7.3.3 beschriebenen Variante).

50 mL DEAE-Überstand wurden mit 25.8 g fein zerriebenem Ammoniumsulfat portionsweise versetzt (80%ige AMS Sättigung der Lösung). Nach jeder AMS-Zugabe wurde solange gerührt, bis alles AMS gelöst war. Der Extrakt wurde für 15 min bei 4°C belassen und abschließend für 12 min bei 15.000g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und das Pellet in 6 mL Puffer D aufgenommen und resuspendiert.

Das AMS-Präzipitat wurde in Puffer C entsalzt und mit Glycerol versetzt bis eine Konzentration von 20% (v/v) Glycerol erreicht war. Der Extrakt („AMS-Fraktion“) wurde in

1.5 mL Eppendorf-Vials überführt, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei –80°C gelagert. Macroassays der AMS-Fraktion wurden in Puffer C durchgeführt, der zusätzlich 6 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> als Phosphohydrolasen-Inhibitor enthält.

### 7.3.5 Dye-Liganden-Test-Kit

Die acht Säulen mit verschiedenen Dye-Liganden-Phasen (*Sigma*) wurden zunächst mit je 25 mL Puffer D äquilibriert. Sodann wurden je 200 µL Enzymextrakt (DEAE-Fraktion, bzw. AMS-Fraktion) aufgetragen. Die Säulen wurden mit 0.5 mL Puffer D gespült und der Durchlauf verworfen. Weitere 2.0 mL Puffer D wurden aufgetragen und der entsprechende Durchlauf gesammelt (Dye-Durchlauf) und in Micro- und Macroassays auf Synthase-Aktivität untersucht. Die Säulen wurden mit weiteren 10 mL Puffer C gewaschen. Abschließend wurden 2 mL 1.5 M KCl in Puffer D hinzugefügt und das entsprechende Eluat aufgefangen (Dye-KCl-Eluat) und in Micro- und Macroassays auf Synthase-Aktivität untersucht.

### 7.3.6 Dye Red 120-Chromatographie

5 mL der Dye-Phase (*Sigma*) wurden mit Puffer E in eine 10 x 1 cm Säule überführt und mit 50 mL Puffer E gespült (Flow: 0.5 mL min<sup>-1</sup>). Zur weiteren Regenerierung der Phase wurde für jeweils 90 min bei einem Flow von 0.5 mL min<sup>-1</sup> mit folgenden Lösungen gespült: 0.1 M Natriummetaborat/1.0M KCl-Lösung (pH 9.8); 0.1 M Natriummetaborat-Lösung (pH 9.8); H<sub>2</sub>O; 2.0 M KCl-Lösung; Puffer E.

3 mL Enzymextrakt (DEAE-Fraktion bzw. AMS-Fraktion) wurden auf die Säule geladen. Die Säule wurde sodann mit Puffer E gespült und die ersten 5 mL des Eluats verworfen (Flow: 0.5 mL min<sup>-1</sup>). Danach wurde das Eluat fraktioniert gesammelt (0.75 mL/Fraktion) und jede Fraktion in Microassays auf Synthase-Aktivität untersucht (Red 120-Durchlauf). Nach 30 min wurde die Säule mit 1.5 M KCl in Puffer E gespült und das Eluat für weitere 30 min fraktioniert gesammelt (0.75 mL/Fraktion) und auf Synthase-Aktivität untersucht. Aktive Fraktionen des KCl-Eluats wurden sofort in Puffer E entsalzt und standen weiteren Aufreinigungen zur Verfügung (Red 120-KCl-Eluat).

### 7.3.7 Hydroxylapatit-Chromatographie (FPLC)

3 mL der DEAE-Fraktion wurden in Puffer F entsalzt und auf die mit Puffer F äquilibrierte Hydroxylapatit-Säule geladen (FPLC-System, Flow: 0.5 mL min<sup>-1</sup>). Proteine wurden mit folgendem schrittweisen Gradientenprogramm von Puffer F und Puffer G eluiert und fraktioniert aufgefangen (0.75 mL/Fraktion):

Elutionsvolumen (mL)	Puffer F (%)	Puffer G (%)
0	100	0
1	100	0
7	91	9
26	86	14
36	0	100
40	0	100

Die Fraktionen wurden in Microassays auf Synthase-Aktivität untersucht. Aktive Fraktionen wurden gepoolt, in Puffer E entsalzt und standen für weitere Aufreinigungen bzw. Macroassays zur Verfügung (Hydroxylapatit-Fraktion).

### 7.3.8 MonoQ-Chromatographie (FPLC)

8 mL der Red 120-Fraktionen bzw. der Hydroxylapatit-Fraktion wurden auf eine mit Puffer H äquilibrierte MonoQ-Säule (FPLC-System, Flow: 0.75 mL min<sup>-1</sup>) geladen. Proteine wurden mit folgendem schrittweisen Gradientenprogramm von Puffer H und 2.0 M KCl Puffer H eluiert und fraktioniert aufgefangen (0.75 mL/Fraktion):

Elutionsvolumen (mL)	Puffer H (%)	2.0 M KCl-Puffer H (%)
0	100	0
1	100	0
7	95	5
21	89	11
31	0	100
40	0	100

Die Fraktionen wurden in Microassays auf Synthase-Aktivität untersucht, aktive Fraktionen gepoolt und in Puffer E entsalzt für weitere Aufreinigungen bzw. Macroassays {MonoQ-Fraktionen der (-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase, (+)-Germacren-D-Synthase bzw. (-)-Germacren-D-Synthase}.

### 7.3.9 Gelfiltration (FPLC)

Für die Eichung der Superdex75 Säule wurde diese zunächst mit Puffer I äquilibriert. Sodann wurden 200  $\mu$ L einer Proteineichlösung {Cytochrom c (12.4 kDa, 0.75 mg mL<sup>-1</sup>); Ribonuclease A (13.7 kDa, 2 mg mL<sup>-1</sup>);  $\alpha$ -Chymotrypsinogen (25 kDa, 0.75 mg mL<sup>-1</sup>);

Ovalbumin (45 kDa, 1 mg mL<sup>-1</sup>); Rinder-Serumalbumin (67 kDa, 1 mg mL<sup>-1</sup>) auf die Säule aufgetragen und mit einem Flow von 0.5 mL min<sup>-1</sup> Puffer I eluiert. Die Detektion der Proteine erfolgte per UV-Detektion bei 280 nm. Aus den so ermittelten Elutionsvolumina der Eichproteine konnte eine logarithmische Eichgrade ermittelt werden.

Für die Trennung von Synthasen wurde die Säule mit Puffer H äquilibriert und 200 µL Enzymextrakt (MonoQ-Fractionen) injiziert. Die MonoQ-Fractionen, deren Volumen zwischen 2 – 3 mL betrug, wurden zuvor durch Ultrafiltration auf ein Volumen von 300 µL konzentriert. Die Synthasen wurden mit einem Flow von 0.5 mL min<sup>-1</sup> Puffer H eluiert und fraktioniert gesammelt (0.5 mL/Fraktion). Die Fraktionen wurden auf Synthese-Aktivität untersucht (Microassays), aktive Fraktionen gepoolt und in Macroassays analysiert. Die molare Masse von Synthasen wurde durch Auftragung der Aktivität einzelner Fraktionen gegen das Elutionsvolumen und anschließendem Abgleich mit der zuvor erstellten Eichgrade ermittelt.

### 7.3.10 Microassay

20 µL des zu analysierenden Enzymextraktes wurden mit 80 µL Puffer E verdünnt (bzw. für Gelfiltrationsfraktionen: 50 µL Extrakt + 50 µL Puffer E) und mit 20 µM [<sup>3</sup>H]-FDP (50 Ci mol<sup>-1</sup>) inkubiert. Bei MonoQ- und Gelfiltrationsfraktionen wurde die Lösung mit 65 nM [<sup>3</sup>H]-FDP (15·10<sup>3</sup> Ci mol<sup>-1</sup>) inkubiert, um auch geringe Aktivitäten zu detektieren (um das Assay empfindlicher zu gestalten, wird die gleiche Menge an radioaktiv markiertem FDP zugefügt, allerdings wird dieses <sup>3</sup>H-FDP nicht weiter mit unmarkiertem FDP verdünnt). Die Inkubationsmischung wurde in einem 1.5 mL Eppendorf-Vial mit 1000 µL Hexan überschichtet und für 30 min bei 30°C inkubiert.

Anschließend wurde die Mischung heftig geschüttelt (Vortexer) und die Phasen durch kurze Zentrifugation bei 500g getrennt. 750 µL der Hexan-Phase wurden abpipettiert und in ein 1.5 µL Eppendorf-Vial überführt in dem sich 40 mg Kieselgel befanden, um Farnesol zu binden. Nach erneutem Schütteln und Zentrifugieren wurden 500 µL der Hexan-Phase abpipettiert, in 4.5 mL Szintillations-Cocktail Ultima Gold<sup>TM</sup> (Packard) gegeben und die Radioaktivität gemessen.

### 7.3.11 Macroassay I (Radioassay)

0.5 mL Enzymfraktion wurden in einem 8 mL Reagenzglas mit 0.5 mL Puffer E verdünnt, mit 1 mL Pentan (destilliert) überschichtet und mit 20 µM [<sup>3</sup>H]-FDP (50 Ci mol<sup>-1</sup>) inkubiert. Fraktionen mit geringer Aktivität wurden alternativ mit 65 nM [<sup>3</sup>H]-FDP (15·10<sup>3</sup> Ci mol<sup>-1</sup>) inkubiert. Die Mischung wurde für 1 h bei 30°C inkubiert, abschließend heftig geschüttelt. Die Phasen wurden durch Zentrifugation bei 1.500g getrennt.

Die organische Phase wurde abgetrennt und die wäßrige Phase zweimal mit je 1 mL Diethylether (destilliert) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über eine

kurze Aluminiumoxid-Säule (0.9 g, Grade III) mit MgSO<sub>4</sub>-Schicht (40 mg) gereinigt (Laufmittel: Diethylether, destilliert). Die gereinigten organischen Phasen wurden unter einem leichten Stickstoffstrom auf ein Volumen von 50 µL eingengt und per Radio-GC-Analyse untersucht.

Macroassay I wurde alternativ auch mit 0.5 mL Enzymextrakten durchgeführt, die zuvor durch 3 minütiges Erhitzen auf 100°C denaturiert wurden. Diese Experimente dienten als Kontrollexperimente.

### 7.3.12 Macroassay II (Deuteriumassay)

30 mL der DEAE-Fraktion wurden in 3 mL Portionen auf zehn 8 mL Reagenzgläser aufgeteilt und jede DEAE-Portion wurde mit 80 µM [10-<sup>2</sup>H]-FDP, (*1R*)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP, [1,1-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>-FDP] oder (*1S*)-[1-<sup>2</sup>H]-FDP inkubiert. Die zehn Inkubationsmischungen wurden mit je 1 mL Pentan (destilliert) überschichtet, für 1 h bei 30°C inkubiert, abschließend heftig geschüttelt und die Phasen durch Zentrifugation bei 1.500g getrennt.

Die organischen Phasen wurden abgetrennt und die wässrigen Phasen zweimal mit je 1 mL Pentan/Diethylether 4:1 (destilliert) extrahiert. Die vereinigten organischen Phasen wurden über kurze Aluminiumoxid-Säulen (0.9 g, Grade III) mit MgSO<sub>4</sub>-Schicht (40 mg) gereinigt (Laufmittel: Pentan/Diethylether 4:1, destilliert). Die gereinigten und vereinigten organischen Phasen wurden unter einem leichten Stickstoffstrom auf ein Volumen von 100 µL eingengt und per GC-MS und Linked Scan-MS analysiert.

### 7.3.13 Oxidationsexperiment

Für die Detektion von Monooxygenasen-Aktivität wurde ein modifizierter Enzymrohextrakt erstellt. Es wurde nach demselben Protokoll gearbeitet wie in Kapitel 7.3.2 (Enzymrohextrakt) beschrieben. Als Extraktionspuffer wurde jedoch Puffer J verwendet. Anstelle von zwei Zentrifugationen wurde nur eine Zentrifugation bei 4.500g durchgeführt und das Zentrifugat durch Glaswolle filtriert. Das Filtrat wurde in Puffer K entsalzt (Monooxygenasen-Fraktion).

2 mL Monooxygenasen-Fraktion wurden mit 1 mM NADPH, 5 mM Glucose-6-Phosphat und 1 unit Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase versetzt (NADPH bildendes System). Diese Mischung wurde mit 130 nM [<sup>3</sup>H]-FDP (15·10<sup>3</sup> Ci mol<sup>-1</sup>) für 1 h bei 30°C inkubiert. Die Inkubationen wurden anschließend analog Macroassay I (Kapitel 7.3.11) aufgearbeitet und die Assay-Produkte per Radio-GC analysiert.

Zusätzlich wurden Inkubationen unter denselben Bedingungen mit zuvor denaturiertem Enzymextrakt durchgeführt (Kontrollexperiment).

### 7.3.14 Bestimmung der Linearität der Produktbildung

20  $\mu\text{L}$  bzw. 10  $\mu\text{L}$  der MonoQ-Fraktion {(+)- und (-)-Germacren-D-Synthase} und der Hydroxylapatit-Fraktion {(-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase} wurden mit 80  $\mu\text{L}$  bzw. 90  $\mu\text{L}$  Puffer E versetzt und mit 2  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-FDP ( $1000 \text{ Ci mol}^{-1}$ ) unter Microassay-Bedingungen (siehe Kapitel 7.3.10) inkubiert und aufgearbeitet.

Im Gegensatz zu Standard-Microassays wurden die Inkubationen allerdings nach 5, 10, 20, 30, 40, 50, bzw. 60 min abgebrochen. Eine Auftragung der gemessenen Radioaktivität gegen die Inkubationszeit lieferte die Zeitabhängigkeit der Produktbildung. Alle Assays wurden doppelt ausgeführt, um statistische Fehler zu minimieren.

### 7.3.15 Bestimmung der $K_M$ -Werte

20  $\mu\text{L}$  der MonoQ- bzw. Hydroxylapatit-Fraktionen von den zu analysierenden Synthesen wurden mit 80  $\mu\text{L}$  Puffer E versetzt und mit 200, 150, 100, 50, 30, 20, 10, 5, 3, 2, bzw. 1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]-FDP ( $50 \text{ Ci mol}^{-1}$ ) unter Microassay-Bedingungen (siehe Kapitel 7.3.10) inkubiert und aufgearbeitet.

Die Auftragung der gemessenen Radioaktivität gegen die Substratkonzentration lieferte die Michaelis-Menten-Kurve. Alle Assays wurden doppelt ausgeführt, um statistische Fehler zu minimieren.

### 7.3.16 Bestimmung des pH-Optimums

20  $\mu\text{L}$  der MonoQ- bzw. Hydroxylapatit-Fraktionen von den zu analysierenden Synthesen wurden mit 80  $\mu\text{L}$  modifiziertem Puffer E versetzt und mit 65 nM [ $^3\text{H}$ ]-FDP ( $15 \cdot 10^3 \text{ Ci mol}^{-1}$ ) unter Microassay-Bedingungen (siehe Kapitel 7.3.10) inkubiert und aufgearbeitet. Puffer E wurde dahingehend modifiziert, daß pH-Werte von pH 5.5 bis pH 9.0 eingestellt werden konnten. Dazu wurde in Puffer E Mopso teilweise durch Mes und Tris ersetzt:

Puffer	Mes	Mopso	Tris
pH	5.5; 6.0; 6.5	6.5; 6.75; 7.0; 7.25; 7.5	7.5; 8.0; 8.5; 9.0

Die Auftragung der gemessenen Radioaktivität gegen den pH-Wert lieferte eine Gauß-Kurve, deren Maximum das pH-Optimum definierte. Alle Assays wurden doppelt ausgeführt, um statistische Fehler zu minimieren.

## 8 Anhang: Meßergebnisse der Microassays

Im folgendem werden in tabellarischer Form alle Meßergebnisse von Microassays aufgelistet, die zur Bestimmung von Linearität,  $K_M$ -Wert und pH-Optimum durchgeführt wurden. Die daraus resultierenden Ergebnisse und graphischen Auswertungen wurden bereits im Speziellen Teil dieser Arbeit erläutert.

**Linearität** (siehe auch Kapitel 7.3.14, Seite 146). Alle Werte in dpm. Die Meßwerte bei verschiedenen Verdünnungen sind jeweils Mittelwerte aus zwei Meßwerten.

Zeit [min]	(-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase		(+) -Germacren-D-Synthase		(-)-Germacren-D-Synthase	
	1:5-Verd.	1:10-Verd.	1:5-Verd.	1:10-Verd.	1:5-Verd.	1:10-Verd.
5	3241.93	2058.17	1889.915	878.715	2640.325	1481.35
10	5556.005	3054.355	2562.43	1073.12	3981.41	2062.69
20	8030.56	3936.705	3552.385	1718.235	6688.145	3543.69
30	10324.315	5254.39	4875.18	2083.33	8276.75	4188.945
40	11456.35	6583.325	6541.16	2691.045	10756.55	5450.1
50	11314.7	7325.485	7361.365	3085.935	11771.2	6304.16
60	15975.2	7460.275	7929.42	3293.585	11825.6	7040.035

**$K_M$ -Wert** (siehe auch Kapitel 7.3.15, Seite 146). Alle Werte in dpm.

Conc. [ $\mu$ M]	(-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase		(+) -Germacren-D-Synthase		(-)-Germacren-D-Synthase	
	1. Wert	2. Wert	1. Wert	2. Wert	1. Wert	2. Wert
1	227.15	350.06	6.26	73.72	24.02	31.85
2	514.07	402.59	143.25	164.98	377.76	329.02
3	622.07	547.27	195.8	166.78	507.44	455.72
5	732.57	742.93	222.5	220.91	574.94	524.94
10	986.51	998.36	360.08	326	593.39	604.73
20	1339.25	865.21	441.01	403.58	767.62	803.44
30	-	-	519.17	459.67	757.15	854.3
50	1389.17	1245.87	579.96	543.35	798.68	808.67
100	1344.49	1642.21	635.52	672.31	832.22	950.74
150	1647.4	1697.27	-	-	808.77	950.91
200	1503.01	1443.01	642.78	634.32	951.25	1161.22

**pH-Optimum** (siehe auch Kapitel 7.3.16, Seite 146). Alle Werte in dpm.

pH (Puffer)	(-)- $\alpha$ -Gurjunen-Synthase		(+) - Germacren-D-Synthase		(-)-Germacren-D-Synthase	
	1. Wert	2. Wert	1. Wert	2. Wert	1. Wert	2. Wert
5.5 (Mes)	1075.62	1120.76	40.87	61.97	79.60	36.22
6.0 (Mes)	1727.85	1818.31	117.38	106.2	85.51	70.54
6.5 (Mes)	1939.79	1256.37	131.66	167.82	58.75	104.36
6.5 (Mopso)	1359.35	2078.68	135.36	118.1	120.75	115.90
6.75 (Mopso)	1953.2	2922.97	98.72	90.61	110.40	131.80
7.0 (Mopso)	2433.35	2841.29	168.56	117.11	97.81	84.75
7.25 (Mopso)	2598.4	2636.79	142.95	137.3	70.78	113.36
7.5 (Mopso)	3250.8	6130.81	109.33	128.89	69.45	78.43
7.5 (Tris)	2285.5	2503.31	125.07	110.96	70.38	69.72
7.75 (Tris)	-	-	129.6	138.49	-	-
8.0 (Tris)	2818.8	2643.61	100.81	107.83	111.13	100.99
8.5 (Tris)	1975.19	3054.47	79.67	27.52	65.08	55.11
9.0 (Tris)	2343.41	2512.83	47.87	24.99	40.03	23.97

## 9 Gefahrstoffanhang

### Liste der gefährlichen Stoffe

Verbindung	Gef.-Symbol	R-Sätze	S-Sätze
Acetanhydrid	C	10-34	26-45
Acetonitril	F, T	11-23/24/25	16-27-45
Ammoniak (32%)	C	34-37	7-26-36/37/39-45
Ammoniumformiat	Xi	36/37/38	26-36
Ammoniumhydrogen- carbonat	Xn	22	-
Buthyllithium (1.6 M in Hexan)	F, C	11-14/15-17-34-48/20	6.1-7/9-26-33-36/37/39-46
Cer-(III)-chlorid	Xi	41	26-39
Chloroform-d <sub>1</sub>	Xn	22-38-40-48/20/22	36/37
3-Chlorperbenzoesäure	O, Xi	7-36/37/38	3/7-14.10-36/37/39
Cyclohexenon	T	10-22-23/24	45
Dichlormethan	Xn	20-40	24
Diethylether	F <sup>+</sup>	12-19	9-16-29-33
Dioxan	F, Xn	11-19-36/37-40	16-36/37
EDTA	Xi	22	-
Ethanol	F	11	7-16
Ethylacetat	F	11	16-33-29-33
Ethyltriphenylphospho- niumbromid	Xn	21	36/37
[1(n)- <sup>3</sup> H]-FDP	F	11	7-16
Glycerol	Xn	22	-
Hexan	Xn, F	11-48/20	9-16-24/25-29-51
Kaliumcarbonat	Xn	22-36	22-26
Mangan-(IV)-oxid	Xn	20/22	25
Mes	Xn	36/37/38	26-36
Methan	F	12	9-16-33
Methanol	F, T	11-23/25	7-16-24-45
Methanol-d <sub>4</sub>	F, T	11-23/25	7-16-24-45

**Tab. 15** Gefahrenkennzeichnung der verwendeten Substanzen (Teil 1).

Verbindung	Gef.-Symbol	R-Sätze	S-Sätze
Methyliodid	T	21-23/25-37/38-40	36/37-38-45
Mopso	Xn	36/37/38	26-36
Natriumbordeuterid	F, T	11-15-34-23/24/25	16-43-36
Natriummetabisulfit	Xn	22-31-37-41	26-39
Natriummetaborat	Xn	36/37/38	26-36
Natriummetaperiodat	O	8	-
Natriummetavanadat	T	25	45
Pentan	F	11	9-16-29-33
Perchlorsäure (65%)	C	31-34	26-38.1-36/37/39-45
Petrolether	F	11	9-16-29-33
Phosphorsäure (85%)	C	34	26-36/37/39-45
Pyridin	F, Xn	11-20/21/22	26-28.1
Pyridiniumdichromat	T	8-45-36/37/38-23/24/25	53-17-26-27-36/37/39
Schwefelsäure (98%)	C	35	26-30-45
Silbernitrat	C	34	26-45
Tetrahydrofuran	F, Xi	11-19-37/37	16-29-33
Trichloracetonitril	T	23/24/25	45
Triethylamin	F, Xi	11-36/37	16-26-29
Wasserstoff	F	12	9-16-33

**Tab. 15** Gefahrenkennzeichnung der verwendeten Substanzen (Teil 2).

## 10 Publikationen und Präsentationen

- [a] C.O. Schmidt, H.J. Bouwmeester, J.-W. De Kraker, W.A. König  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **37** (1998) 1400 - 1402  
Biosynthesis of (+)- and (-)-germacrene D in *Solidago canadensis*: Isolation and characterization of two enantioselective germacrene D synthases.  
  
*Angew. Chem.*, **110** (1998) 1489 – 1481  
Biosynthese von (+)- und (-)-Germacren D in *Solidago canadensis*: Isolierung und Charakterisierung zweier enantioselektiver Germacren-D-Synthasen.
- [b] C.O. Schmidt, H.J. Bouwmeester, J.-W. De Kraker, W.A. König  
Oral Presentation at the *Phytochemical Society of Europe Symposium* „Future Trends in Phytochemistry“; May 10 – 13, 1998; Rolduc, The Netherlands  
Biosynthesis of (+)- and (-)-Germacrene D in *Solidago canadensis*.
- [c] C.O. Schmidt, H.J. Bouwmeester, S. Franke, W.A. König  
*Chirality* (akzeptiert)  
Mechanisms of the Biosynthesis of Sesquiterpene Enantiomers (+)- and (-)-Germacrene D in *Solidago canadensis*.
- [d] C.O. Schmidt, H.J. Bouwmeester, N. Bülow, W.A. König  
*Arch. Biophys. Biochem.* (eingereicht)  
Isolation, Characterization and Mechanistic Studies of (-)- $\alpha$ -Gurjunene Synthase from *Solidago canadensis*.
- [e] C.O. Schmidt, H.J. Bouwmeester, J.-W. De Kraker, W.A. König  
Poster Presentation at the *10<sup>th</sup> International Symposium on Chiral Discrimination*; August 30 – September 2, 1998; Vienna, Austria  
Biosynthesis of (+)- and (-)-Germacrene D: Involved Enzymes and their Mechanisms.
- [f] C.O. Schmidt, H.J. Bouwmeester, J.-W. De Kraker, W.A. König  
Poster Presentation at the *29<sup>th</sup> International Symposium on Essential Oils*; September 6 – 9, 1998; Frankfurt am Main, Germany  
Biosynthesis of Germacrene D Enantiomers in *Solidago canadensis*: Enzyme Isolation and Mechanistic Studies.
- [g] H.J. Bouwmeester, J.P.F.G. Helsper, J.-W. de Kraker, C.O. Schmidt, J.A.R. Davies  
*Production of valuable plant secondary metabolites* in: Annual Report 1997 of the Research Institute for Agrobiolgy and Soil Fertility, ProPress BV, Wageningen (1998).
- [h] H.J. Bouwmeester, E. Wallaart, M.H.A. Janssen, B. van Loo, B.J.M. Jansen, M.A. Posthumus, C.O. Schmidt, J.-W. de Kraker, W.A. König, M.C.R. Franssen  
*Plant Physiol.* (eingereicht)  
Partial purification and characterization of amorpho-4,11-diene synthase. The sesquiterpene synthase catalyzing the first step in the biosynthesis of artemisinin.



# 11 Index

<b>A</b>			
Abbaureaktionen	23		
Acetatweg	6, 17, 18		
AMS-Präzipitation	33		
Durchführung	141		
für (+)-Germacren-D-Synthase	53		
Antibiotika	2		
Antioxidantien	31		
Aristolochen-Synthase	25		
Assay			
radioaktiv	40		
Ätherische Öle	2		
Aroma	12		
Darstellung	11		
von <i>Solidago canadensis</i>	114		
<b>B</b>			
Bergamoten-Synthase	23		
Biosynthese			
von Sesquiterpenen	5, 11, 17		
Bisabolen-Synthase	23		
<b>C</b>			
Capsidiol	28		
Carveol	30		
Carvon	4, 30		
Caryophyllen-Synthase	23		
Chiralität	2		
Co-Faktor	27		
Constant loss-Messung	95		
Contergan	5		
Coomassie Plus-Protein-Assay	51		
Cotton-Effekt	4		
Cramer und Böhm			
Methode von	85		
Curlon	36		
Cyclisierungsmechanismen	91		
für Germacren D	82		
für Gurjunen	113		
Cyclocolorenol			
Struktur	117		
Versuche zur Synthese	117		
Cyclocolorenon			
als Oxidationsprodukt von Gurjunen	114		
Struktur	36		
Vorkommen und Bedeutung	39		
Cyclodextrine	4, 14		
Derivatisierungen	15		
Cyclohexenol			
Synthese	86		
Cytochrome P-450	30		
Cytochrome P450-Monooxygenase	115		
Cytosol	18		
<b>D</b>			
DEAE-Anionenaustauscher-Chromatographie	45		
		Batch-Verfahren	53
		Durchführung	141
		Dehydrogenase	31, 115
		Denaturierung	31
		Deoxy-D-xylulose	18
		deutert	20
		Detergenzien	32
		Deuterierungsgrad	87
		Deuterium-Markierungen	83
		Dialyse	33
		Dimethylallyldiphosphat	20
		DNA	34
		von Synthasen	34
		Dünnschicht-Chromatographie	12, 124
		Dye Red 120-Chromatographie	
		Durchführung	142
		Dye-Liganden-Test-Kit	
		Durchführung	142
		Dye-Liganden-Chromatographie	33
		Test-Kit	47
<b>E</b>			
		Elternionen-Scans	95
		Enantiomere	2
		optische Reinheit	3
		Enantiomerenanalytik	14, 16
		Entsalzungssäulen	
		Handhabung	126
		Entsorgung gefährlicher Stoffe	123
		Enzym	
		aktives Zentrum	27
		Enzymrohextrakt-Darstellung	140
		Isolierung	31, 39
		Rohextrakt	32
		5-epi-Aristolochen-Synthase	27
<b>F</b>			
		Farnesol	
		als Assay-Produkt	45
		Farnesyldiphosphat	5
		Biosynthese	20
		Synthesen	82
		Synthetase	20
		Fast-Protein-Liquid-Chromatography	
		Durchführung	126
		FDP	
		Synthese von (1R)-d-FDP	84
		Synthese von (1S)-d-FDP	87
		Synthese von 1,1-d <sub>2</sub> -FDP	88
		Synthese von 10-d-FDP	89
		FDP-Analoga	84
		Flüssig-Chromatographie	124
		FPLC	
		Durchführung	126
		Trennleistung	47
<b>G</b>			
		Gaschromatographie	14

Chirale Selektoren	4	molare Masse	71
Präparative	37	Multi-Produkt-Synthese	63
präparative-GC	15	pH-Optimum	79
zweidimensionale-GC	15	Reinigungstabelle	62
Gauß-Funktion	80		
Gelelektrophorese	33	<b>H</b>	
diskontinuierliche	66	HLADH	84
Laemmli-System	66	Funktionsweise	88
Prinzip	65	HMG-CoA-Reduktase	17
Gelfiltration	33	Hochleistungs-Flüssig-Chromatographie	124
Durchführung	143	Homogenität	
für Gurjunen-Synthese	61	von Synthesen	68
Kalibrierung	69	Horse-Liver-Alcohol-Dehydrogenase	84
Prinzip	66	HPLC	12, 85, 124
Geranyldiphosphat	20	Durchführung	124
Germacren A	31	Humulen-Synthese	23, 26
Germacren-C-Synthese	26	Hybrid-Shift	21, 82
Germacren D		1,2-Hybrid-Shift	102
(-)-Germacren-D-Biosynthese	5	1,3-Hybrid-Shift	98
Bedeutung	39	Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie	33
Biologische Aktivität	39	Hydroxylapatit-Chromatographie	33
Isolierung (Durchführung)	128	Durchführung	142
Linked Scan MS für deuteriertes (-)-Germacren D	100	für Gurjunen-Synthese	60
Massenspektren von deuteriertem (+)-Germacren D	103		
Massenspektrum	96	<b>I</b>	
Massenspektren von deuteriertem (-)-Germacren D	96	Inhibitoren	27
Molecular Modelling von (+)-Germacren D	106	vom Acetatweg	19
NMR-Daten	128	Ionenaustauscher-Chromatographie	32
Struktur	35	Isolelektrische Fokussierung	33
Germacren-D-Synthese		Isomer	
Alternative (+)-Germacren-D-Synthese-Isolierung	53	Trennung von Doppelbindungsisomeren	91
Cyclisierungsmechanismus von (-)-Germacren D	95	Isopentenylidiphosphat	6, 17, 20
Cyclisierungsmechanismus von (+)-Germacren D	102	Isomerase	20
Enantioselektivität	51	Isotopieeffekt	87
Gelelektrophorese	67		
Gelfiltration	69	<b>K</b>	
Isolierung	44	Kapillargaschromatographie	
Kinetische Parameter	78	Durchführung	124
Linearität	73	Kinetische Studien	72
Lineweaver-Burk-Diagramm	78	$K_M$ -Werte	
Michaelis-Menten-Diagramm	77	Bestimmung	146
molare Masse	71	Kristallographie	27, 34
pH-Optimum	81		
Reinigungstabelle	52	<b>L</b>	
Stabilität	48	Leaky Synthese	25
Giftstoffe		Limonen	30
Entsorgung und Handhabung	123	Linearitätsexperiment	72
Ginkolid A-Biosynthese	25	Lineweaver-Burk-Diagramm	75
Goldrute	38	Linked Scan-Massenspektrometrie	94
Gurjunen		Linked Scan-Messungen	100
Biosynthese-Mechanismus	112	Lubimin	29
Massenspektren	108		
Massenspektren von deuterierten Gurjunen	109	<b>M</b>	
säurekatalysierte Umlagerung	64	Macroassay	
Struktur	36, 57	Definition	41
Verbleib in <i>S. canadensis</i>	114	Macroassay I (Radioassay)	
Vorkommen und Bedeutung	39	Durchführung	144
Gurjunen-Synthese		Macroassay II (Deuteriumassay)	
Cyclisierungsmechanismus	107	Durchführung	145
Gelelektrophorese	68	Mangandioxid	84
Gelfiltration	71		
Isolierung	57		
Kinetische Parameter	78		
Linearität	73		
Lineweaver-Burk-Diagramm	75		
Michaelis-Menten-Diagramm	75		

Markierungsexperimente mit <sup>13</sup> C	22 24	Pheromone	2
Massenspektrometrie	12	pH-Optimum	
deuterierter Verbindungen	23	Bestimmung	146
Linked Scan-Methode	94	Phosphohydrolasen	32, 53
MS-MS-Technik	95	Inhibitoren	53, 142
Verwendete Geräte	127	Phytoalexin	28
von deuterierten Verbindungen	25	Pilzbefall	29
zur Aufklärung von Cyclisierungsmechanismen	94	Pinen-Synthase	51
Metastabile Ionen	94	Plastiden	18
Methylgruppen-Migration	22	Polyvinylpolypyrrolidon	32
Michaelis-Menten-Kinetik	27, 72, 74	Präparative Gaschromatographie	12
Micro-BCA-Protein-Assay	51	Durchführung	125
Microassay		Protease	31
Definition	40	Protein-Assay	
Durchführung	144	Durchführung	126
Mitochondrien	18	Puffer	
Molare Masse		Zusammensetzung	140
Defintion	65		
Molecular Modelling	104	<b>Q</b>	
Bedeutung	82	Quenchinggas	43
für (-)-Germacren D	99		
Molekularbiologie		<b>R</b>	
Zentrales Dogma der	34	Radioaktivität	
Monooxygenase	30	Sicherheit und Entsorgung	123
MonoQ	33	Radio-Gaschromatographie	41
Durchführung	143	Durchführung	125
für Germacren-D-Synthasen Isolierung	48	Signalform	45
für Gurjunen-Synthase	60	Reaktionsgeschwindigkeit	74
Moose	1	Red 120	
Mosher's Säure	4	für Germacren-D-Synthasen-Isolierung	47
Multi-Produkt-Synthase	25, 107	für Gurjunen-Synthase	59
bei Monoterpenen	51	Rishitin	29
Gurjunen-Synthase	58	RNA	34
		Röntgenbeugung	3
<b>N</b>			
NADPH		<b>S</b>	
Cytochrome P450-Reduktase	115	Schutzgruppen	89
Nerolidyldiphosphat	21	Scrambling	
NMR	12	in Massenspektren	108
COSY	13	SDS-PAGE	
deuterierter Verbindungen	23	Durchführung	126
Lanthanid-Shiftreagzien	4	Prinzip	65
NOESY	13	Selinen-Synthase	26
Verwendete Geräte	127	Sesquiterpenalkohol	
Vor- und Nachteile	92	aus <i>S. canadensis</i>	116
zur Aufklärung von Cyclisierungsmechanismen	92	Sesquiterpene	1
		Analytik	11
		oxigenierte	2
		Strukturaufklärung	12
		Synthasen	21
		Silbernitrat imprägniertes Kieselgel	91
		Silver-Staining	67
		<i>Solidago</i>	
		verschiedene Arten	36
		<i>Solidago canadensis</i>	
		Anwendung in der Heilkunde	38
		Ätherisches Öl	36
		Botanische Systematik	38
		Stabilität	
		von Enzymrohextrakten	45
		Substrat	
		isotopenmarkiert	22
Parfum	2		
Patchoulol-Synthase	25		
Pathogen	28		
PCR	34		
Pentalenen-Synthase	23		
pH-Optimum	28, 79		
pH/2-Werte			
Definition	80		



## 12 Literaturverzeichnis

- [1] G. Rücker  
*Angew. Chem.*, **85** (1973) 895 - 907  
Sesquiterpene.
- [2] W.A. Ayer, L.M. Browne  
*Tetrahedron*, **37** (1981) 2199 - 2248  
Terpenoid Metabolites of Mushrooms and related Basidiomycetes.
- [3] W.A. König, A. Rieck, Y. Saritas, I.H. Hardt, K.H. Kubeczka  
*Phytochemistry*, **42** (1996) 461 - 464  
Sesquiterpene hydrocarbons in the essential oil of *Meum athamanticum*.
- [4] R. Croteau, A. Gundy  
*Arch. Biochem. Biophys.*, **233** (1984) 838 - 841  
Cyclization of Farnesyl Pyrophosphate to the Sesquiterpene Olefins Humulene and Caryophyllene by an Enzyme System from Sage (*Salvia officinalis*).
- [5] a) R.R. Izac, P. Schneider, M. Swain, W. Fenical  
*Tetrahedron Lett.*, **23** (1982) 817 - 820  
New Nor-Sesquiterpenoids of apparent Nardosinane Origin from the Pacific Soft-Coral *Paralemnalia thyrsoidea*.
- b) A.D. Rodriguez  
*Tetrahedron*, **51** (1995) 4571 - 4618  
The natural product chemistry of West Indian gorgonian octocorals.
- c) G.M. König, A.D. Wright  
*J. Org. Chem.*, **62** (1997) 3837 - 3840  
New and unusual sesquiterpenes: kelsoene, prespatane, epi- $\gamma$ -gurjunene and T-cadinthiol, from the tropical marine sponge *Cymbastela hooperi*.
- [6] M.N. Zook, J. Chappell, J.A. Kúć  
*Phytochemistry*, **31** (1992) 3441 - 3445  
Characterization of Elicitor-Induction of Sesquiterpene Cyclase Activity in Potato Tuber Tissue.
- [7] C.J. Persoons, P.E.J. Verwiel, F.J. Ritter, E. Talman, P.J.F. Nooijen, W.J. Nooijen  
*Tetrahedron Lett.*, (1976) 2055 - 2058  
Sex Pheromons of the American Cockroach, *Periplaneta Americana*: A Tentative Structure of Periplanone-B.
- [8] S.C. Jain, S. Nowicki, T. Eisner, J. Meinwald  
*Tetrahedron Lett.*, (1982) 4639 - 4642  
Insect Repellents from Vetiver Oil: I. Zizanal and Epizizanal.
- [9] D.E. Cane, J.S. Oliver, P.H.M. Harrison, C. Abell, B.R. Hubbard, C.T. Kane, R. Lattman  
*J. Am. Chem. Soc.*, **112** (1990) 4513 - 4524  
Biosynthesis of Pentalenene and Pentalenolactone.
- [10] G. Ohloff  
*Riechstoffe und Geruchssinn*, Springer, Berlin (1990).

- [11] F. Engelke  
*Aufbau der Moleküle*, Teubner Verlag, Stuttgart, 2. Auflage (1990).
- [12] J.A. Dale, H.S. Mosher  
*J. Am. Chem. Soc.*, **95** (2) (1973) 512 - 519  
Nuclear Magnetic Resonance Enantiomer Reagents. Configurational Correlations via Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shifts of Diastereomeric Mandelate, O-Methylmandelate, and  $\alpha$ -trifluoromethylphenylacetate (MTPA) Esters.
- [13] E. Gil-Av, B. Feibush, R. Charles-Sigler  
*Tetrahedron Lett.*, (1966) 1009 - 1015  
Separation of Enantiomers by Gas Liquid Chromatography with an Optically Active Stationary Phase.
- [14] W.A. König, I. Benecke, S. Sievers  
*J. Chromatogr.*, **217** (1981) 71 - 79  
New Results in the Gas Chromatographic Separation of Enantiomers of Hydroxy Acids and Carbohydrates.
- [15] V. Schurig  
*Angew. Chem.*, **89** (1977) 113 - 114  
Enantiomerentrennung eines chiralen Olefins durch Komplextrennung an einem optisch aktiven Rhodium(I)-Komplex.
- [16] a) W.A. König, S. Lutz, G. Wenz  
*Angew. Chem.*, **100** (1988) 989 - 990  
Modifizierte Cyclodextrine - neue, hoehenantioselektive Trennphasen für die Gaschromatographie.
- b) W.A. König  
*Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins*, Hüthig, Heidelberg (1992).
- [17] E. Fischer  
*Ber. deutsch chem. G.* **27** (1894) 2985 - 2991  
Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme
- [18] M. Niwa, M. Iguchi, S. Yamamura  
*Chem. Pharm. Bull.*, **28** (3) (1980) 997 - 999  
Co-occurrence of (-) and (+)-Germacrene-D in *Solidago altissima* L.: Determination of the Optical Rotation of optically Pure Germacrene-D.
- [19] D.E. Cane  
*Chem. Rev.*, **90** (1990) 1089 - 1103  
Enzymatic Formation of Sesquiterpenes.
- [20] C.O. Schmidt, H.J. Bouwmeester, S. Franke, W.A. König  
*Chirality* (akzeptiert)  
Mechanisms of the Biosynthesis of Sesquiterpene Enantiomers (+)- and (-)-Germacrene D in *Solidago canadensis*.
- [21] C.D. Poulter, H.C. Rilling  
*Prenyl Transferases and Isomerases* in J.W. Porter, S.L. Spurgeon: *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*, Wiley, New York (1981).

- [22] N. Qureshi, J.W. Porter  
*Conversion of Acetyl-Coenzyme A to Isopentenyl Pyrophosphate* in J.W. Porter, S.L. Spurgeon: *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*, Wiley, New York (1981).
- [23] M.K. Schwarz  
Dissertation, ETH Zürich (1994)  
Terpen-Biosynthese in *Ginkgo biloba*: Eine überraschende Geschichte.
- [24] T. Eicher, L.F. Tietze  
*Organisch-chemisches Grundpraktikum*  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1993).
- [25] E. Guenther, K. Kulka, J.A. Rogers  
*Anal. Chem.*, **33** (1961) 37R – 45R  
Essential Oils and Related Products.
- [26] Y. Saritas  
Diplomarbeit, Universität Hamburg (1995)  
Die Sesquiterpen-Kohlenwasserstoffe im Lebermoos *Marchantia polymorpha*.
- [27] R.R. Heath, J.H. Tumlinson, R.E. Doolittle, A.T. Roveaux  
*J. Chromatog. Sci.*, **13** (1975) 380 - 382  
Silver Nitrate-High Pressure Liquid Chromatography of Geometrical Isomers.
- [28] I.H. Hardt  
Dissertation, Universität Hamburg (1994)  
Präparative enantioselektive Gaschromatographie mit modifizierten Cyclodextrinen und ihre Anwendung in der Isolierung und Analytik von Sesquiterpenen.
- [29] H. Günther  
*NMR-Spektroskopie*  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1973).
- [30] N. Bülow  
Dissertation, Universität Hamburg (voraussichtlich 1998).
- [31] H. Friebolin  
*Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie*  
VCH Verlag, 2. Auflage, Weinheim (1992).
- [32] H. Kessler, M. Gehrke, C. Griesinger  
*Angew. Chem*, **100** (1988) 507 – 554  
Zweidimensionale NMR-Spektroskopie, Grundlagen und Übersicht über die Experimente.
- [33] A. Rieck, N. Bülow, S. Jung, Y. Saritas, W.A. König  
*Phytochemistry*, **49** (1997) 195 - 197  
(+)-1(10)-Spirovetiven-7 $\beta$ -ol from the Liverwort *Lepidozia reptans*.
- [34] A. Rieck, N. Bülow, W.A. König  
*Phytochemistry*, **40** (1995) 847 – 851  
An Epoxy-Trinoreudesmane Sesquiterpene from the Liverwort *Lophocolea bidentata*

- [35] D. Joulain, W.A. König  
*The Atlas of Spectroscopic Data of Sesquiterpene Hydrocarbons*  
Im Druck.
- [36] a) I.H. Hardt, A. Rieck, C. Fricke, W.A. König  
*Flavour Fragrance J.*, **10** (1995) 165 – 171  
Enantiomeric Composition of Sesquiterpene Hydrocarbons of the Essential Oil of *Cedrela odorata* L.
- b) C. Fricke, A. Rieck, I.H. Hardt, W.A. König, H. Muhle  
*Phytochemistry*, **39** (1995) 1119  
Identification of (+)- $\beta$ -Caryophyllene in Essential Oils of Liverworts by Enantioselective Gas Chromatography.
- [37] A. Rieck  
Dissertation, Universität Hamburg (1996)  
Strukturaufklärung und stereochemische Untersuchungen von Sesquiterpenen als Inhaltsstoffe ätherischer Öle.
- [38] M.S. Brown, J.R. Faust, J.L. Goldstein, I. Kaneko, A. Endo  
*J. Biol. Chem.*, **253** (1978) 1121 – 1128  
Induction of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Activity in Human Fibroblasts Incubated with Compactin (ML-236B), A Competitive Inhibitor of the Reductase.
- [39] J. Piel, W. Boland  
*Tetrahedron Lett.*, **38** (1997) 6387 – 6390  
Highly Efficient and Versatile Synthesis of Isotopically Labelled 1-Deoxy-D-xylulose
- [40] F. Lynen, H. Eggerer, U. Henning, I. Kessel  
*Angew. Chem.*, **70** (1958) 738 – 742  
Farnesyl-pyrophosphat und 3-Methyl- $\Delta^3$ -butenyl-1-pyrophosphat, die biologischen Vorstufen des Squalens.
- [41] F. Lynen, B.W. Agranoff, H. Eggerer, U. Henning, E.M. Möslein  
*Angew. Chem.*, **71** (1959) 657 – 603  
 $\gamma,\gamma$ -Dimethyl-allyl-pyrophosphat und Geranyl-pyrophosphat, biologische Vorstufen des Squalens.
- [42] D.E. Cane  
*Biosynthesis of Sesquiterpenes* in J.W. Porter, S.L. Spurgeon: *Biosynthesis of Isoprenoid Compounds*, Wiley, New York (1981).
- [43] R. Evans, J.R. Hanson  
*J. Chem. Soc. Perkin I*, (1976) 326 - 329  
Studies in Terpenoid Biosynthesis. Part XIV. Formation of the Sesquiterpene Trichodiene.
- [44] D.E. Cane, S. Swanson, P.P.N. Murthy  
*J. Am. Chem. Soc.*, **103** (1981) 2136 – 2138  
Trichodiene Biosynthesis and the Enzymatic Cyclization of Farnesyl Pyrophosphate.
- [45] D.E. Cane, H.-J. Ha, C. Pargellis, F. Waldmeier, S. Swanson, P.P.N. Murphy  
*Bioorg. Chem.*, **13** (1985) 246 - 265  
Trichodiene Biosynthesis and the Stereochemistry of the Enzymatic Cyclization of Farnesyl Pyrophosphate.
- [46] P. Anastasis, I. Freer, C. Gilmore, H. Mackie, K.H. Overton, S. Swanson  
*J. Chem. Soc., Chem Commun.*, (1982) 268 – 270  
Cyclisation of Farnesyl Pyrophosphate to  $\gamma$ -Bisabolene in Tissue Cultures of *Andrographis paniculata*.

- [47] D.E. Cane, D.B. McIlwaine, P.H.M. Harrison  
*J. Am. Chem. Soc.*, **111** (1989) 1152 - 1153  
Bergamotene Biosynthesis and the Enzymatic Cyclization of Farnesyl Pyrophosphate.
- [48] P.H.M. Harrison, J.S. Oliver, D.E. Cane  
*J. Am. Chem. Soc.*, **110** (1988) 5922 - 5923  
Pentalene Biosynthesis and the Enzymatic Cyclization of Farnesyl Pyrophosphate. Inversion at C-1 during 11-Membered-Ring Formation.
- [49] T.M. Hohn, R.D. Plattner  
*Arch. Biochem. Biophys.*, **272** (1989) 137 - 143  
Purification and Characterization of the Sesquiterpene Cyclase Aristolochene Synthase from *Penicillium roqueforti*.
- [50] D.E. Cane, P.C. Prabhakaran, E.J. Salaski, P.H.M. Harrison, H. Noguchi, B.J. Rawlings  
*J. Am. Chem. Soc.*, **111** (1989) 8914 - 8916  
Aristolochene Biosynthesis and Enzymatic Cyclization of Farnesyl Pyrophosphate.
- [51] K. Saito, A. Kawaguchi, S. Okuda, Y. Seyama, T. Yamakawa, Y. Nakamura, M. Yamada  
*Plant Cell Physiol.*, **21** (1980) 9 - 19  
Stereospecificity of hydrogen transfer by pyridine nucleotid-dependent enoyl reductases in fatty acid synthesis: Studies with enzymes obtained from developing castor bean seeds and *Chlorella vulgaris*.
- [52] R. Croteau, S.L. Munck, C.C. Akoh, H.J. Fisk, D.M. Satterwhite  
*Arch. Biochem. Biophys.*, **256** (1987) 56 - 68  
Biosynthesis of the Sesquiterpene Patchoulol from Farnesyl Pyrophosphate in Leaf Extracts of *Pogostemon cablin* (Patchouli): Mechanistic Considerations.
- [53] S.L. Munck, R. Croteau  
*Arch. Biochem. Biophys.*, **282** (1990) 58 - 64  
Purification and Characterization of the Sesquiterpene Cyclase Patchoulol Synthase from *Pogostemon cablin*.
- [54] S.M. Colby, J. Crock, B. Dowdle-Rizzo, P.G. Lemaux, R. Croteau  
*Biochemistry*, **95** (1998) 2216 - 2221  
Germacrene C synthase from *Lycopersicon esculentum* cv. VFNT Cherry tomato: cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of the multiple product sesquiterpene cyclase.
- [55] C.L. Steele, J. Crock, J. Bohlmann, R. Croteau  
*J. Biol. Chem.*, **273** (1998) 2078 - 2089  
Sesquiterpene Synthases from Grand Fir (*Abies grandis*).
- [56] D.E. Cane, G. Yang, Q. Xue, J.H. Shim  
*Biochemistry*, **34** (1995) 2471 - 2479  
Trichodiene Synthase. Substrate Specificity and Inhibition.
- [57] C.M. Starks, K. Back, J. Chappell, J.P. Noel  
*Science*, **277** (1997) 1815 - 1820  
Structural Basis for Cyclic Terpene Biosynthesis by Tobacco 5-epi-Aristolochene Synthase.
- [58] K. Nabeta, M. Fujita, K. Komuro, K. Katayama, T. Takasawa  
*J. Chem. Soc. Perkin I*, (1997) 2065 - 2070  
In vitro biosynthesis of cadinanes by cell-free extracts of cultured cells of *Heteroscyphus planus*.
- [59] D. Voet, J.G. Voet  
*Biochemie*  
VCH Verlag, Weinheim (1992).

- [60] H. Cano-Camacho, E. López-Romero, E. Lozoya-Gloria  
*Plant Sci.*, **124** (1997) 23 - 31  
Partial Purification and Characterization of an elicitor stimulated sesquiterpene cyclase from chili pepper (*Capsicum annum* L.) fruits.
- [61] U. Vögeli, J.W. Freeman, J. Chappell  
*Plant Physiol.*, **93** (1990) 182 - 187  
Purification and Characterization of an Inducible Sesquiterpene Cyclase from Elicitor-Treated Tobacco Cell Suspension Cultures.
- [62] E.M. Davis, J. Tsuji, G.D. Davis, M.L. Pierce, M. Essenberg  
*Phytochemistry*, **41** (1996) 1047 - 1055  
Purification of (+)- $\delta$ -Cadinene Synthase, a Sesquiterpene Cyclase from Bacteria-Inoculated Cotton Foliar Tissue.
- [63] H.J. Bouwmeester, M.C.J.M. Konings, J. Gershenzon, F. Karp, R. Croteau  
*Phytochemistry*, im Druck (1998)  
Cytochrome P-450 Dependent (+)-Limonene-6-Hydroxylation in Fruits of Caraway (*Carum carvi*).
- [64] B.A. Halkier  
*Phytochemistry*, **43** (1996) 1 - 21  
Catalytic Activities and Structure/Function Relationships of Cytochrome P450 Enzymes.
- [65] H.J. Bouwmeester, J. Gershenzon, M.C.J.M. Konings, R. Croteau  
*Plant Physiol.*, **117** (1998) 901 - 912  
Biosynthesis of the Monoterpenes Limonene and Carvone in the Fruits of Caraway (*Carum carvi* L.). Demonstration of Enzyme Activities and their Changes with Development.
- [66] J.-W. De Kraker, M.C.R. Franssen, A.d. Groot, W.A. König, H.J. Bouwmeester  
*Plant Physiol.*, **117** (1998) 1381 - 1392  
(+)-Germacrene A Biosynthesis: The Committed Step in the Biosynthesis of Bitter Sesquiterpene Lactones in Chicory.
- [67] M.J.C. Rhodes  
*The Extraction and Purification of Enzymes from Plant Tissues* in: H. Smith (Ed.)  
*Regulation of enzyme synthesis and activity in higher plants. Proceedings of the Phytochemical Society Symposium*, Academic Press, London (1977).
- [68] W.R. Alonso, R. Croteau  
*Prenyltransferases and cyclases* in: P.M. Dey, J.B. Harborne (Eds.) *Methods in plant biochemistry*, Vol. 9, *Enzymes of secondary metabolism* (P.J. Lea, Ed.), Academic Press, London (1993).
- [69] R. Croteau, F. Karp  
*Arch. Biochem. Biophys.*, **198** (1979) 523 - 532  
Biosynthesis of Monoterpenes: Hydrolysis of Bornyl Pyrophosphate, an Essential Step in Camphor Biosynthesis, and Hydrolysis of Geranyl Pyrophosphate, the Acyclic Precursor of Camphor, by Enzymes from Sage (*Sage officinalis*).
- [70] Pharmacia Handbook  
*FPLC Ion Exchange and Chromatofocussing. Principles and methods*, Offsetcenter AB, Sweden (1985).
- [71] Pharmacia Handbook  
*Hydrophobic Interaction Chromatography. Principles and methods*, Västra Aros Tryckeri AB, Västerås, Sweden (1993).

- [72] P. Karlson, D. Doenecke, J. Koolman  
*Biochemie*, Thieme Verlag, Stuttgart, 14. Auflage (1994)
- [73] X.-Y. Chen, Y. Chen, P. Heinsteins, V.J. Davisson  
*Arch. Biochem. Biophys.*, **324** (1995) 255 - 266  
Cloning, Expression, and Characterization of (+)- $\delta$ -Cadinene Synthase: A Catalyst for Cotton Phytoalexin Biosynthesis.
- [74] K. Back, J. Chappell  
*J. Biol. Chem.*, **270** (1995) 7375 - 7381  
Cloning and Bacterial Expression of a Sesquiterpene Cyclase from *Hyocymus muticus* and Its Molecular Comparison to Related Terpene Cyclases.
- [75] D.E. Cane, Z. Wu, R.H. Proctor, T.M. Hohn  
*Arch. Biochem. Biophys.*, **300** (1993) 415 - 419  
Overexpression in *Escheria coli* of Soluble Aristolochene Synthase from *Penicillium roqueforti*.
- [76] S.M. Colby, W.R. Alonso, E.J. Katahira, D.J. McGarvey, R. Croteau  
*J. Biol. Chem.*, **268** (1993) 23016 - 23024  
4S-Limonene Synthase from the Oil Glands of Spearmint (*Mentha spicata*).
- [77] S.D. Lorimer, R.T. Weavers  
*Phytochemistry*, **26** (1987) 3207 - 3215  
Foliage sesquiterpenes and diterpenes of *Podocarpus spicatus*.
- [78] W.A. König, N. Bülow, C. Fricke, S. Melching, A. Rieck, H. Muhle  
*Phytochemistry*, **43** (1996) 629 - 633  
The sesquiterpenes of the liverwort *Preissia quadrata*.
- [79] J.K. Peterson, R.J. Horvat, K.D. Elsey  
*J. Chem. Ecol.*, **20** (1994) 2099 - 2109  
Squash Leaf Glandular Trichome Volatiles: Identification and Influence on Behavior of Female Pickleworm Moth.
- [80] N. Bülow, W.A. König  
*Essential oils: basic and applied research in: Ch. Franz, A. Mathe, G. Buchbauer: Proceed. of the 27<sup>th</sup> intern. symposium on essential oils, Vienna, Allured Publ.Corp. Carol Stream, Ill.* (1996) 209 - 213.
- [81] P. Weyerstahl, H. Marschall, C. Christiansen, D. Kalemba, J. Góra  
*Planta Med.*, **59** (1993) 281 - 282  
Constituents of the Essential Oil of *Solidago canadensis* ("Goldenrod") from Poland - A Correction.
- [82] R. Hänsel, K. Keller, H. Rimpler, G. Schneider (Hrsg.)  
*Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis (Drogen P-Z)*, Band 6, Springer Verlag, Berlin, 5. Auflage (1994).
- [83] W. Rothmaler, E. Jäger, R. Schubert, K. Werner  
*Exkursionsflora. Band 3: Atlas der Gefäßpflanze*, Volk und Wissen Verlag, Berlin, 8. Auflage (1991).
- [84] H. Bader  
*Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie*, VCH-Verlag, Weinheim, 2. Auflage (1985).

- [85] M. Pahlow  
*Heilpflanzen Kompaß*, Gräfe und Unzer Verlag, München, 4. Auflage (1982).
- [86] C. Kitamura, S. Takahashi, S. Tahara, J. Mizutani  
*Agr. Biol. Chem.*, **40** (1976) 1965 - 1969  
A Sex Stimulant to the Male American Cockroach in Plants.
- [87] B. Weißbecker, S. Schütz, A. Klein, H.E. Hummel  
*Talanta*, **44** (1997) 2217 - 2224  
Analysis of volatiles emitted by potato plants by means of a Colorado beetle electroantennographic detector.
- [88] C. Nishino, W.S. Bowers  
*Nature*, **262** (1976) 487 - 489  
Antennal receptor response to sex pheromone mimics in the American cockroach.
- [89] K. Yoshihara, Y. Ohta, T. Sakai, Y. Hirose  
*Tetrahedron Lett.*, (1969) 2263 - 2264  
Germacrene D, a Key Intermediate of Cadinene Group Compounds and Bourbonenes.
- [90] N. Tsubaki, K. Nishimura, Y. Hirose  
*Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **40** (1967) 597 - 600  
Hydrocarbons in Patchouli Oil.
- [91] J. Streith, P. Pesnelle, G. Ourisson  
*Tetrahedron Lett.*, **15** (1962) 677 - 682  
L<sup>α</sup>-Gurjunen.
- [92] K. Bauer, D. Garbe, H. Surburg  
*Common Fragrance and Flavor Material. Preparation, properties and uses*,  
VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1990).
- [93] J. Krepinsky, V. Herout  
*Coll. Czech. Chem. Commun.*, **27** (1962) 2459 - 2462  
Isolation of terpenic compounds from *Solidago canadensis* L.
- [94] Y. Asakawa, T. Aratani  
*Bull. Soc. chim. France*, (1976) 1469 - 1470  
Sesquiterpenes of *Porella vernicosa* (Hepaticae).
- [95] J.M. Jacyno, N. Montemurro, A.D. Bates, H.G. Cutler  
*J. Agric. Food Chem.*, **39** (1991) 1166 - 1168  
Phytotoxic and Antimicrobial Properties of Cyclocolorone from *Magnolia grandiflora* L.
- [96] L. Belingheri, A. Cartayrade, G. Pauly, M. Gleizes  
*Plant Sci.*, **84** (1992) 129 - 136  
Partial purification and properties of the sesquiterpene  $\beta$ -selinene cyclase from *Citrofortunella mitis* fruits.
- [97] P. McGeady, H.-J. Pyun, R. Coates, R. Croteau  
*Arch. Biochem. Biophys.*, **299** (1992) 63 - 72  
Biosynthesis of Monoterpenes: Inhibition of (+)-Pinene and (-)-Pinene Cyclases by Thia and Aza Analogs of the 4R- and 4S- $\alpha$ -Terpinyl Carbocation.
- [98] B. Bröcker  
*dtv-Atlas zur Atomphysik*, dtv-Verlag, München, 3. Auflage (1985).

- [99] C.O. Schmidt, H.J. Bouwmeester, J.-W. De Kraker, W.A. König  
*Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **37** (1998) 1400 - 1402  
Biosynthesis of (+)- and (-)-germacrene D in *Solidago canadensis*: Isolation and characterization of two enantioselective germacrene D synthases.
- [100] S.S. Dehal, R. Croteau  
*Arch. Biochem. Biophys.*, **261** (1988) 346 - 356  
Partial Purification and Characterization of Two Sesquiterpene Cyclases from Sage (*Salvia officinalis*) Which Catalyze the Respective Conversion of Farnesyl Pyrophosphate to Humulene and Caryophyllene.
- [101] E.J. Pennings, A.H. Meijer, L.H. Stevens, R. Verpoorte  
*Phytochem. Anal.*, **2** (1991) 191 - 198  
The Applications of Hydrophobic Interaction Chromatography to the Purification of Plant Proteins.
- [102] N. Lanznaster, R. Croteau  
*Protein Expression Purif.*, **2** (1991) 69 -74  
Dye-Ligand and Immobilized Metal Ion Interaction Chromatography for the Purification of Enzymes of Prenyl Pyrophosphate Metabolism.
- [103] H. Gambliel, R. Croteau  
*J. Biol. Chem.*, **257** (1982) 2335 - 2342  
Biosynthesis of (+/-)- $\alpha$ -Pinene and (-)- $\beta$ -Pinene from Geranyl Pyrophosphate by a Soluble Enzyme System from Sage (*Salvia officinalis*).
- [104] H. Gambliel, R. Croteau  
*J. Biol. Chem.*, **259** (1984) 740 - 748  
Pinene Cyclases I and II.
- [105] T.J. Savage, H. Ichii, S.D. Hume, D.B. Little, R. Croteau  
*Arch. Biochem. Biophys.*, **320** (1995) 257 - 265  
Monoterpene Synthase from Gymnosperms and Angiosperms: Stereospecificity and Inactivation by Cysteiny- and Arginyl-Directed Modifying Reagents.
- [106] W.J.H. Berkel  
*Biochemical Separation Methods*, Skript der Wageningen Agricultural University, Wageningen, 3. Auflage (1997).
- [107] C.O. Schmidt, H.J. Bouwmeester, N. Bülow, W.A. König  
*Arch. Biochem. Biophys.* (eingereicht)  
Isolation, Characterization and Mechanistic Studies of (-)- $\alpha$ -Gurjunene Synthase from *Solidago canadensis*.
- [108] R. Faure, E.M. Gydou, O. Rakotonirainy  
*J. Chem. Soc. Perkin Trans II*, (1987) 341 - 344  
Two-dimensional Nuclear Magnetic Resonance of Sesquiterpenes. Part 2. Total Assignment of (+)-Aromadendrene, (+)-Longicyclene, and  $\gamma$ -Gurjunene by the Two-dimensional INADEQUATE Method.
- [109] C. Ehret, G. Ourisson  
*Bull. Soc. chim. France*, (1968) 1785 - 1799  
Isomerisation de L $\alpha$ -Gurjunen.
- [110] L. Stryer  
*Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, 3. Auflage (1988).

- [111] D.V. Banthorpe, J.T. Brown, G.S. Morris  
*Phytochemistry*, **31** (1992) 3391 - 3395  
Partial Purification of Farnesyl Pyrophosphate: Drimenol Cyclase and Geranylgeranyl Pyrophosphate: Sclareol Cyclase, using Cell Culture as a Source of Material.
- [112] I.M. Goldman  
*J. Org. Chem.*, **34** (1969) 1979 - 1981  
Activation of Manganese Dioxide by Azeotropic Removal of Water.
- [113] Autorenkollektiv  
*Organikum*, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 17. Auflage (1988).
- [114] a) H. Theorell, R. Bonnichsen  
*Acta Chem. Scand.*, **5** (1951) 1105 - 1126  
Studies on Liver Alcohol Dehydrogenase.
- b) H. Theorell, J.S. McKinley-McKee  
*Acta Chem. Scand.*, **15** (1961) 1797 - 1810  
Liver Alcohol Dehydrogenase I. Kinetics and Equilibria without Inhibitors.
- [115] V.P. Fernandez, H.R. Mahler, J. V. J. Shiner  
*Biochemistry*, **1** (1962) 259 - 262  
Studies on the Mechanism of Enzyme-Catalysed Oxidation Reduction Reactions. V. An Exchange Reaction Catalysed by Liver Alcohol Dehydrogenase.
- [116] a) A.P. Nygaard, H. Theorell  
*Acta Chem. Scand.*, **9** (1955) 1300 - 1305  
The Reaction Mechanism of Yeast Alcohol Dehydrogenase (ADH), Studied by Overall Reaction Velocities.
- b) M.B. Smith  
*Organic Synthesis*, McGraw-Hill International Editions, New York (1994).
- [117] F. Cramer, W. Böhm  
*Angew. Chem.*, **71** (1959) 775  
Synthese von Geranyl- und Farnesylpyrophosphat.
- [118] G. Popják, J.W. Cornforth, R.H. Cornforth, R. Ryhage, D.S. Goodman  
*J. Biol. Chem.*, **237** (1962) 56 - 61  
Studies on the Biosynthesis of Cholesterol.
- [119] V.M. Dixit, F.M. Laskovics, W.I. Noall, C.D. Poulter  
*J. Org. Chem.*, **46** (1981) 1967 - 1969  
Tris(tetra-n-butylammonium) Hydrogen Pyrophosphate. A New Reagent for the Preparation of Allylic Pyrophosphate Esters.
- [120] D. Zhang, C.D. Poulter  
*Anal. Biochem.*, **213** (1983) 356 - 361  
Analysis and Purification of Phosphorylated Isoprenoids by Reversed-Phase HPLC.
- [121] S.S. Sofer, H.C. Rilling  
*J. Lipid Res.*, **10** (1969) 183 - 187  
Mechanism of squalene biosynthesis: evidence against the involvement of free nerolidyl pyrophosphate.

- [122] L.F. Tietze, T. Eicher  
*Reaktionen und Synthesen im organisch-chemischen Praktikum und Forschungslaboratorium*, Thieme Verlag, Stuttgart (1988).
- [123] L.L. Danilov, T.N. Druzhinina, N.A. Kalinchuk, S.D. Maltsev, V.N. Shibaev  
*Chem. Phys. Lipids*, **51** (1989) 191 - 203  
Polyprenyl phosphates: synthesis and structure-activity relationship for a biosynthetic system of *Salmonella anatum* O-specific polysaccharide.
- [124] L. Pohl  
*Kontakte*, (1976) 42 - 48  
Die Analyse von deuterierten Verbindungen.
- [125] P. Sykes  
*Reaktionsmechanismen der Organischen Chemie*, VCH-Verlag, Weinheim, 9. Auflage (1988).
- [126] D.E. Cane, R. Iyengar, M.-S. Shiao  
*J. Am. Chem. Soc.*, **103** (1981) 914 - 931  
Cyclonerolidol Biosynthesis and the Enzymatic Conversion of Farnesyl to Nerolidyl Pyrophosphate.
- [127] A. Streitwieser, C.H. Heathcock  
*Organische Chemie*, VCH-Verlag, Weinheim (1990).
- [128] L.H. Stevens  
Dissertation, Rijksuniversiteit te Leiden (1994)  
Formation and Conversion of strictosidine in the biosynthesis of monoterpenoid indole and quinoline alkaloids.
- [129] H.H. Mantsch, H. Saito, I.C.P. Smith  
*Prog. NMR Spectr.*, **11** (1977) 211 - 271  
Deuterium Magnetic Resonance, Applications in Chemistry, Physics and Biology.
- [130] D.E. Cane, S.L. Buchwald  
*J. Am. Chem. Soc.*, **99** (1977) 6132 - 6134  
Applications of Deuterium Magnetic Resonance to Biosynthetic Studies: 1. Biosynthesis of Ovalicin.
- [131] K.L. Busch, G.L. Glish, S.A. McLuckey  
*Mass Spectrometry/Mass Spectrometry: Techniques and Applications of Tandem Mass Spectrometry*, VCH-Verlag, New York (1988).
- [132] M.E. Rose, R.A.W. Johnstone  
*Mass Spectrometry for Chemists and Biochemists*, Cambridge University Press London (1982).
- [133] R.K. Boyd, J.H. Beynon  
*Org. Mass Spectrom.*, **12** (1977) 163 - 165  
Scanning of Sector Mass Spectrometers to Observe the Fragmentations of Metastable Ions.
- [134] W.F. Haddon  
*Org. Mass Spectrom.*, **15** (1980) 539 - 543  
The Constant Neutral Linked Magnetic Field-Electric Sector scan.

- [135] E.L. Eliel  
*Organische Stereochemie*, Wiley-Verlag, New York (1994).
- [136] R.P. Donaldson, D.G. Luster  
*Plant Physiol.*, **96** (1991) 669 - 674  
Multiple Forms of Plant Cytochromes P-450.
- [137] J.Krepinsky, V. Herout  
*Coll. Czech. Chem. Commun.*, **27** (1962) 2459 - 2462  
Isolation of terpenic compounds from *Solidago canadensis* L.

## Danksagung – Acknowledgement

Ich danke der Stiftung Stipendien-Fonds im Verband der Chemischen Industrie e.V. für die Gewährung eines Doktorandenstipendiums.

I'd like to thank Dr. Harro Bouwmeester who always helped me and gave me lots of optimistic ideas and advises for all my experiments,

all members of the Plant-Physiology Department, especially Jan-Willem De Kraker and Joke de Jong for the nice working conditions at the AB-DLO and their everlasting „positive thinking“.

Ich danke Herrn Dr. V. Sinnwell und seinem NMR-Service für die Aufnahme von  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektren sowie Herrn Dr. E. Haupt und seinem NMR-Service für die Aufnahme von  $^{31}\text{P}$ -NMR Spektren,

Herrn Dr. S. Franke danke ich für die Durchführung der Linked-Scan-MS Messungen,

Frau A. Meiners und Herrn M. Preuße für die Aufnahme einiger GC-MS Messungen,

Frau Dipl. Chem. U. Warmers für das schnelle und gründliche Korrekturlesen der Arbeit,

Herrn Dipl. Chem. N. Bülow für die Überlassung eines racemischen  $\alpha$ -Gurjunen Standards.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises gilt mein Dank für die gute Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang Stefan Jung, Martin Pietsch, Klaus Scharwächter, Ute Warmers und Kolja Wihstutz für die interessanten Diskussionen, die den Arbeitsalltag erleichterten.

Bei meinen Eltern möchte ich mich besonders für ihre verständnisvolle Unterstützung während des Studiums und der Promotion bedanken.

## Curriculum Vitae

### *Persönliche Daten*

Name: Claus Oliver Schmidt  
Geburtsort: Hamburg (Bundesrepublik Deutschland)  
Geburtsdatum: 29. Oktober 1971  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### *Schulbildung*

1978 – 1982 Grundschule „Ludwig-Frahm-Schule“, Hamburg  
1982 – 1991 „Carl-von-Ossietzky-Gymnasium“, Hamburg  
11. Juni 1991 Erlangung der „Allgemeinen Hochschulreife“ (Abitur)

### *Hochschulausbildung*

1. Oktober 1991 Immatrikulation an der Universität Hamburg für  
den Studiengang „Diplom-Chemie“  
29. Oktober 1993 Vordiplom Chemie  
Januar – April 1995 Studienaufenthalt an der University of Newcastle upon Tyne im  
Rahmen des ERASMUS-Programmes der EU  
6. September 1996 Diplom Chemie  
Diplomarbeit in dem Arbeitskreis von Prof. Dr. W.A. König,  
Thema: Isolierung und Identifizierung von leichtflüchtigen  
Komponenten aus dem Baupilz *Fomes fomentarius*  
Oktober 1996 Beginn der vorliegenden Dissertation

### *Promotionsstellen*

1. Januar 1997 - Promotionsstipendium der Stiftung Stipendien-Fonds  
31. Dezember 1998 im Verband der Chemischen Industrie e.V.