

- 1. Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der metallabhängigen Isoprenyldiphosphatsynthase *PcIDS1***
- 2. Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Terpencyclase *MstE* aus aquatischen Cyanobakterien**

Felix Ecker

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Natural Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Lukas Hintermann
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Michael Groll
2. Prof. Dr. Franz Hagn
3. Prof. Dr. Wilhelm Boland

Die Dissertation wurde am 24.10.2022 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Natural Sciences am 17.01.2023 angenommen.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary.....	3
1. Einleitung	5
1.1. Die Isoprenyldiphosphatsynthase <i>PcIDS1</i>	5
1.1.1. Biosynthese der Isoprenyldiphosphate	5
1.1.2. Kettenverlängerung der Isoprenyldiphosphate.....	6
1.1.3. Phylogenetische Entwicklung der IDS	8
1.1.4. Die Rolle von GPP und FPP im Insekten-Stoffwechsel.....	10
1.1.5. Metallregulation im Insektenstoffwechsel	11
1.2. Die Merosterolsäure-Synthase MstE	12
1.2.1. Die biologische Rolle zyklischer Triterpene	12
1.2.2. Die Evolution der Terpencyclasen	13
1.2.3. Meroterpenyclasen als Vorläufer der β -Architektur	15
2. Aufgabenstellung.....	16
3. Material und Methoden	17
3.1. Material.....	17
3.1.1. Chemikalien.....	17
3.1.2. Geräte und Zubehör	17
3.1.3. Medien	19
3.1.4. Molekularbiologische Reagenzien	19
3.2. Methoden	25
3.2.1. Klonierung der Expressionsplasmide	25
3.2.2. Einführung von Einzelpunktmutationen.....	26
3.2.3. Rekombinante Expression	27
3.2.4. Proteinreinigung	27
3.2.5. Thermal Shift Assay	28
3.2.6. Proteinkristallisation.....	29
3.2.7. Röntgenstrukturbestimmung	29
3.2.8. Datenauswertung und -aufbereitung.....	30
4. Ergebnisse.....	31
4.1. <i>PcIDS1</i> aus <i>Phaedon cochleariae</i>	31
4.1.1. Klonierung, Expression und Reinigung	31
4.1.2. Thermal Shift Assay	32
4.1.3. Kristallisation und Strukturbestimmung.....	34
4.1.4. Prinzipien der Katalyse in <i>PcIDS1</i>	36
4.1.5. GPP-Bindung bricht die Dimersymmetrie	40
4.1.6. ZOL erzwingt Dimersymmetrie	41
4.1.7. Mn^{2+} steigert die Ligandenaffinität	42
4.1.8. Die allosterische Regulation von <i>PcIDS1</i>	45
4.2. MstE aus <i>Scytonema</i>	49
4.2.1. Klonierung, Expression und Reinigung	49
4.2.2. Kristallisation und Strukturbestimmung.....	49
4.2.3. MstE bindet prenylierte Dihydroxybenzoate.....	51
4.2.4. Das Produkt Merosterolsäure verbleibt im Enzym.....	52
4.2.5. Manipulation des Produktspektrums	54
5. Diskussion	56
5.1. <i>PcIDS1</i> aus <i>Phaedon cochleariae</i>	56
5.2. MstE aus <i>Scytonema</i>	59
6. Literaturverzeichnis	63
7. Anhang	68

7.1.	Proteinsequenzen	68
7.2.	Kristallographische Statistiken	69
7.3.	Auswertung <i>PcIDS1</i>	76
7.4.	Auswertung <i>MstE</i>	78
8.	Publikationen	79
	Danksagung.....	81
	Eidesstattliche Erklärung	82

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
ACAT	Acetoacetyl-CoA-Synthase
ADP	Adenosindiphosphat
A _{konf}	Konformation A
Al	allylisch
Allo	allosterisch
ATP	Adenosintriphosphat
B _{konf}	Konformation B
BP	Bisphosphonat
CDP-MEP	4-Diphosphocytidyl-2C-methyl-D-erythritol
CH	Schweiz
CLD	chain-length determination
CMP	Cytidinmonophosphat
CoA	Coenzym A
COSY	Correlation Spectroscopy
CTP	Cytidintriphosphat
dd	doppelt-destilliert
DE	Deutschland
DHB	Dihydroxybenzoat
DMAPP	Dimethylallylpyrophosphat
DMSPP	Dimethylallyl-S-thiolodiphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DXP	1-Desoxy-D-xylulose-5-phosphat
DXS	DXP-Synthase
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ETH	Eidgenössische Technische Hochschule
FARM	erstes asparaginsäure-reiches Motiv
FPP	Farnesylpyrophosphat
FPPS	FPP-Synthase
F _s -DHB	Farnesyl-Dihydroxybenzoesäure
GAP	Glycerinaldehyd-3-phosphat
GFPP	Geranylarnesylpyrophosphat
GG-DHB	Geranylgeranyl-Dihydroxybenzoesäure
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GPP	Geranylpyrophosphat
GPPS	GPP-Synthase
HAl	homoallylisch
HepPP	Heptaprenylpyrophosphat
HexPP	Hexaprenylpyrophosphat
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HMBPP	(<i>E</i>)-4-Hydroxy-3-methylbut-2-enyldiphosphat
HMG	3-Hydroxy-3-methylglutaryl
HMGCR	HMG-CoA-Reduktase
HMGCS	HMG-CoA-Synthase
HMI	heavy metal ion
HPLC-MS	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
IDI	Isopentenylidiphosphatisomerase
IDS	Isoprenyldiphosphatsynthase
IPP	Isopentenylpyrophosphat
IT	Italien
JP	Japan
Kan ₅₀	50 mg/L Kanamycin
kB	Kilobase
LB	Lysogeny Broth
lc	langkettig
MA	Merosterolsäure A
MB	Merosterolsäure B
mc	mittelkettig
MDD	Mevalonat-diphosphatdecarboxylase
MEP	2 <i>C</i> -Methyl-D-erythritol-4-phosphat
MEP-Weg	Methylerythritolphosphatweg
MES	2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure
MPD	2-Methyl-2,4-pentandiol
MPI	Max-Planck-Institut
MVA-Weg	Mevalonatweg
MVK	Mevalonatkinase
NADP ⁺	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
OPP	Octaprenylpyrophosphat
OSC	Oxidosqualencyclase
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
<i>Pc</i>	<i>Phaedon cochleariae</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMK	Phosphomevalonatkinase
PP	Pyrophosphat
PP _{Al}	allylisches PP
PP _{Allo}	allosterisches PP
PP _{HAl}	homoallylisches PP
PP _i	anorganisches PP
ROESY	Rotating frame Overhauser Enhancement Spectroscopy
SARM	zweites asparaginsäure-reiches Motiv

sc	kurzkettig
SDS	Natriumdodecylsulfat
SE	Squalenepoxidase
SHC	Squalen-Hopen-Cyclase
SMI	Schwermetallion/en
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
sp.	species
SQS	Squalensynthase
SubA	Untereinheit A
SubB	Untereinheit B
SWE	Schweden
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TPS	Terpensynthase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSA	Thermal Shift Assay
UK	Vereinigtes Königreich
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
WT	Wildtyp
WW	Wechselwirkung
ZOL	Zoledronsäure

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der biochemischen und strukturellen Charakterisierung von Reaktionsmechanismen, die von Enzymen in der Terpenbiosynthese katalysiert werden. Terpene und Terpenoide stellen eine große Gruppe von Naturstoffen dar, die fast 80.000 bekannte Substanzen umfasst, von denen jeden Tag viele weitere charakterisiert werden. Sie wurden bereits in Sedimenten gefunden, die Milliarden von Jahren alt sind und spielen eine zentrale Rolle in allen Bereichen des Lebens, von einzelligen Organismen auf dem Meeresgrund bis hin zu Nadelbäumen auf den Gipfeln der höchsten Berge.¹ Seitdem haben sie sich zu biochemischen Schlüsselfiguren wie Hormonen, Vitaminen oder Abwehrstoffen entwickelt und sind für die Integrität von Membranen, den Elektronentransport und Proteinmodifikation unverzichtbar. Während ihre grundlegenden biologischen Funktionen größtenteils gut verstanden sind, erweisen sich neu entdeckte Terpene mit antibakteriellen, antimykotischen, entzündungshemmenden oder immunsuppressiven Eigenschaften als höchst interessant für medizinische und landwirtschaftliche Anwendungen.

Trotz ihrer Vielfalt stammen alle Terpene von den isomeren C₅-Substraten Isopentenyl- (IPP) und Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) ab. Die anfängliche Elongation zu Geranyl- (GPP) und Farnesylpyrophosphat (FPP) wird durch kurzkettenige Isoprenyldiphosphatsynthasen (scIDS) katalysiert. Während die Produktspezifität von scIDS üblicherweise mit der Zugänglichkeit des aktiven Zentrums in Verbindung gebracht wird, zeigt ein kürzlich identifizierter Vertreter aus dem Blattkäfer *Phaedon cochleariae* (*PcIDS1*) unterschiedliche Aktivität in Abhängigkeit verschiedener zweiwertiger Metallionen.² In Anwesenheit von Mg²⁺ als Co-Faktor produziert *PcIDS1* hauptsächlich FPP, eine Vorstufe zu Juvenilhormonen, während schon Spuren von Co²⁺ oder Mn²⁺ das Produktspektrum in Richtung GPP verschieben, dem Substrat defensiver Monoterpene. Um diesen außergewöhnlichen Regulationsmechanismus zu charakterisieren, wurde die Kristallstruktur des homodimeren *PcIDS1* unter Verwendung der Phasen eines funktionell homologen Proteins gelöst. In Kombination mit thermischen Shift-Assays (TSA) wurden die Bindemodi verschiedener Substrate, Produkte und Inhibitoren identifiziert und durch Punktmutationen validiert. Durch die Zugabe von Mn²⁺ und den Nachweis seiner anomalen Röntgenstreuung konnte die signifikante Bindungspräferenz von *PcIDS1* für Schwermetallionen (SMI) verifiziert werden. Insgesamt fünfzehn verschiedene Kristallstrukturen halfen bei der Charakterisierung der Interaktion zwischen den Dimer-Untereinheiten. Während sowohl DMAPP als auch GPP austauschbar durch Mg²⁺ und Mn²⁺ koordiniert werden können, findet die Bildung von FPP jeweils nur in einer Domäne statt. Diese Ergebnisse deuten auf ein kompliziertes regulatorisches Netzwerk hin, das die höhere Lewis-Azidität der SMI ausnutzt, um die GPP-Bildung zu beschleunigen. Gleichzeitig wird der unkontrollierte Verbrauch von DMAPP und IPP durch allosterische GPP-Bindung unterbunden, was eine Ähnlichkeit zur menschlichen FPP-Synthase aufwirft.³ Dieser dynamische Mechanismus erweist sich als nützlich für den schnellen Lebenszyklus von Insekten, insbesondere während der Metamorphose, könnte aber auch in anderen Organismen eine Rolle spielen.

Eine weitere wichtige Untergruppe der Terpene sind die Steroide, Verbindungen mit drei Cyclohexan- und einem Cyclopentanring, die von Terpenocyclasen aus dem gemeinsamen Triterpenvorläufer Squalen (C₃₀) hergestellt und häufig stark modifiziert werden.

Terpencyclasen werden mechanistisch in Klasse I (dephosphorylierungsabhängig) und II (protonierungsinitiiert) unterteilt und folgen einer gemeinsamen Domänenarchitektur. Ein bekanntes Beispiel ist die membrangebundene $\beta\gamma$ -Domäne der Oxidosqualen- (OSC), sowie Squalen-Hopen-Cyclasen (SHC). Kürzlich wurde jedoch eine Monodomänen-Cyclase der Klasse II namens Merosterolsäure-Synthase (MstE) in dem Cyanobakterium *Scytonema* sp. PCC 10023 identifiziert.⁴ Um herauszufinden, wie das Enzym seine Aktivität ohne den Beitrag einer γ -Domäne zur Architektur des aktiven Zentrums erreicht, wurde eine erste Röntgenstruktur von MstE mit nahezu atomarer Auflösung auf der Grundlage eines modifizierten SHC-Modells phasiert. Durch die Verwendung von Farnesyl-Dihydroxybenzoesäure (Fs-DHB) anstelle des Ubichinon-ähnlichen Substrats Geranylgeranyl-DHB (GG-DHB) wurde ein definierter Substratbindungskanal zwischen ausgeprägten Loopregionen auf der konservierten α_6 - α_6 -Fass-Struktur identifiziert. Das Surrogat nimmt dabei eine lineare Orientierung in der katalytischen Tasche an und schottet sie mit seiner polaren DHB-Kopfgruppe von der Umgebung ab. Gleichzeitig ist der Prenylrest aber zu kurz, um protoniert zu werden und eine Zyklisierung durchzuführen. Neben dem Asparaginsäurerest D109, der für die Initiierung der Reaktionskaskade verantwortlich ist, wurden weitere Seitenketten in einem strukturgeleiteten Ansatz modifiziert. Durch die Einführung von Asparagin an der Protonierungsstelle konnte MstE erfolgreich mit seinem natürlichen Substrat co-kristallisiert werden. Überraschenderweise bindet eine D109A-Mutante das zyklische Produkt Merosterolsäure A (MA), das sich während des Kristallisationsprozesses bildete. Ein Vergleich der Strukturen unterstreicht die Rolle des Gatekeeper-Rests Y157, der als Sensor für die Anwesenheit von DHB fungiert, nach der Reaktion aber durch die starre Geometrie von MA verdrängt wird. Auf Grundlage dieser Ergebnisse identifizierten Aktivitätsuntersuchungen mit der Y157A-Variante, die von der Gruppe um Prof. Dr. Jörn Piel (ETH Zürich) durchgeführt wurden, ein neues trizyklisches Produkt (Merosterolsäure B, MB), das durch vorzeitige Beendigung der Zyklisierungskaskade entsteht. Während MA eine Vorstufe für natürlich vorkommende Meroterpene mit potenziellen pharmazeutischen Anwendungen ist, ähnelt MB den Fasciochinolen, die als natürliche Antibiotika wirken, und bietet einen Anhaltspunkt für die chemoenzymatische Synthese von Terpenen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Arbeit die Terpenbiosynthese in all ihren Facetten umfasst. Ausgehend von einfachen, aktivierten C_5 -Einheiten, die anschließend in streng regulierten Prozessen zu einer Vielzahl von Bausteinen kombiniert werden, entstehen einige der kompliziertesten organischen Moleküle der Erde. Da nur ein Bruchteil des riesigen Pools an Terpenen identifiziert wurde, wird die Forschung auf diesem Gebiet noch über viele Jahre neuartige Naturstoffe hervorbringen.

Summary

This thesis focusses on the biochemical and structural characterisation of reaction mechanisms catalysed by enzymes in terpene biosynthesis. Terpenes and terpenoids represent a vast group of natural products, comprising close to 80,000 known substances with many more characterized every day. Already found in sediments dating back billions of years,¹ they play a pivotal role in all domains of life, ranging from unicellular organisms on the ocean bed to conifers on top of the highest mountains. They have since evolved into biochemical key players as hormones, vitamins or defensive agents and are indispensable for membrane integrity, electron transport and protein modification. While their basic biological functions are mostly well understood, newly found terpenes with antibacterial, antifungal, anti-inflammatory or immunosuppressive properties prove highly interesting for medical and agricultural applications.

Despite their diversity, all terpenes originate from the isomeric C₅ substrates isopentenyl (IPP) and dimethylallyl pyrophosphate (DMAPP). Initial elongation to geranyl (GPP) and farnesyl pyrophosphate (FPP) is catalysed by short chain isoprenyl diphosphate synthases (scIDS). While product specificity is commonly associated with the depth of their catalytic site, a recently identified scIDS in the leaf beetle *Phaedon cochleariae* (*PcIDS1*) displays distinct activity in response to different bivalent metal ions.² In presence of only Mg²⁺ as co-factor it produces mainly FPP, an essential precursor for juvenile hormones, while even trace amounts of Co²⁺ or Mn²⁺ shift the product spectrum towards GPP, the substrate for defensive monoterpenoids. To characterise these additional means of regulation, the crystal structure of homodimeric *PcIDS1* was solved by applying phases from a known functional homologue. In combination with thermal shift assays (TSA), the binding modes of different substrates, products and inhibitors were identified and validated by single-point mutations. By applying Mn²⁺ and detecting its anomalous X-ray scattering, the significant binding preference of *PcIDS1* for heavy metal ions (HMI) was verified. A total of fifteen different crystal structures helped characterise inter-subunit communication across the dimer interface. While both DMAPP and GPP can be coordinated by Mg²⁺ and Mn²⁺ interchangeably, the formation of FPP takes place in only one subunit at a time. Based on these findings, an intricate regulatory network is suggested that responds to the higher Lewis acidity of HMIs to accelerate GPP formation. At the same time, uncontrolled depletion of DMAPP and IPP is prevented by allosteric GPP binding that bears resemblance to the human FPP synthase.³ This highly flexible mechanism proves useful for the rapid life cycle of insects, especially while undergoing metamorphosis, but might also be present in other organisms.

One of the most important subgroups of terpenoids are steroids, compounds comprised of three cyclohexane and a cyclopentane ring that are produced by terpene cyclases from the common triterpene precursor squalene (C₃₀) and often undergo severe modification. Separated by their mechanistic nature into class I (dephosphorylation dependent) and II (protonation initiated), terpene cyclases follow a common domain architecture. A well-known example is the membrane-bound βγ-didomain assembly of oxidosqualene (OSC) and squalene-hopene cyclases (SHC). Recently however, a monodomain class II cyclase termed merosterolic acid synthase (MstE) was identified in the cyanobacterium *Scytonema* sp. PCC 10023.⁴ To evaluate how the enzyme achieves activity without the contribution of a γ-domain to the active site architecture, a first near-atomic resolution X-ray structure of MstE was solved based on a

truncated squalene-hopene cyclase model. By applying farnesyl dihydroxy benzoic acid (Fs-DHB), instead of the ubiquinone-like substrate geranylgeranyl DHB (GG-DHB), a defined substrate binding channel was later identified between pronounced coil regions on top of the conserved α_6 - α_6 barrel fold. This linear surrogate binds tail-first into the catalytic cleft, sealing it off from the environment with its polar DHB head group while the prenyl moiety is too short to reach the site of protonation and undergo cyclization. Apart from the aspartic acid residue D109 responsible for initiating the reaction cascade, several other sidechains were modified in a structure guided approach. By introducing asparagine at the protonation site, MstE was successfully co-crystallized with its natural substrate, validating earlier insights obtained with Fs-DHB. Surprisingly, a D109A mutant did retain the entire cyclic product merosterolic acid A (MA) that formed through residual enzymatic activity over the crystallization process. A comparison between the structures highlighted the role of the gatekeeper residue Y157 that acts as a sensor for the presence of DHB but is subsequently displaced by the rigid geometry of MA. Based on these results, activity assays with the Y157A variant of MstE performed by the group of Prof. Dr. Jörn Piel (ETH Zürich) identified a novel tricyclic product (merosterolic acid B, MB) that formed through premature termination of the cyclisation cascade. While MA is a precursor for naturally occurring meroterpenes with potential pharmaceutical applications, MB resembles fascioquinols that act as natural antibiotics and offers a first step for the chemoenzymatic synthesis of terpenes.

In conclusion, this work encompasses terpene biosynthesis in all its facets. Starting from simple, activated C₅ units that are subsequently combined in tightly regulated pathways to form a variety of building blocks, it ends up with some of the most intricate organic molecules on earth. With only a fraction of the vast pool of terpenes identified, research in this field will continue to reveal novel natural products for years to come.

1. Einleitung

Terpene stellen mit inzwischen etwa 80.000 identifizierten Mitgliedern eine der umfangreichsten Klassen unter den Naturprodukten dar.⁵ Trotz ihres im Grundsatz einfachen und konservierten Aufbaus aus achiralen Synthesevorläufern unterschiedlicher Länge, übernehmen sie in nahezu allen Aspekten des Lebens zentrale Rollen, sei es in der intrazellulären Signaltransduktion, dem Elektronentransport, als Bestandteil von Zellmembranen oder als intra- und extrazelluläre Informationsüberträger in Form von Pigmenten, Hormonen, sowie Lock- und Abwehrstoffen.⁶ Insbesondere Terpene, die von Pflanzen und Bakterien in oftmals beachtlichem Maßstab produziert und sekretiert werden, weisen bisweilen vielversprechende anti-mykotische, -bakterielle oder -kanzerogene Eigenschaften auf, die für die pharmazeutische Anwendung von großem Interesse sind.^{7,8} Viele dieser Naturstoffe haben ihren Ursprung allerdings in nicht- oder nur schwer kultivierbaren Organismen, die wiederum auf eine hoch-spezialisierte, enzymatische Biosynthese angewiesen sind.⁹ Oftmals lässt sich das fragliche Terpen selbst nach intensiver, chemischer Identifikation und Analyse nur in begrenztem Maßstab synthetisch herstellen, bleibt aber durch den anspruchsvollen Ursprungsorganismus auch der Extraktion vorenthalten. Deshalb stellt die biochemische und strukturbiologische Aufklärung der an der Terpen-Biosynthese beteiligten Enzyme eine wichtige Grundlage dar, um diese Stoffgruppe einer potenziellen pharmazeutischen, landwirtschaftlichen oder industriellen Nutzung zu erschließen.¹⁰

1.1. Die Isoprenyldiphosphatsynthase *PcIDS1*

1.1.1. Biosynthese der Isoprenyldiphosphate

Allen Terpenen und Terpenoiden gemein ist die Entstehung aus zwei isomeren Vorläufermolekülen, Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) und Isopentenylpyrophosphat (IPP). Diese sind Endprodukte zweier individueller Biosynthesewege, dem Mevalonatweg (MVA, Abb. 1a) und dem Methylerythritolphosphatweg (MEP, Abb. 1b). Während der MVA-Weg in Eukaryoten und Archaeen vorherrscht, stellt der MEP-Weg aufgrund seines exklusiven Auftretens in Bakterien, Protozoen, Algen, sowie höheren Pflanzen auch für die medizinische Anwendung einen vielversprechenden Angriffspunkt dar.^{11,12}

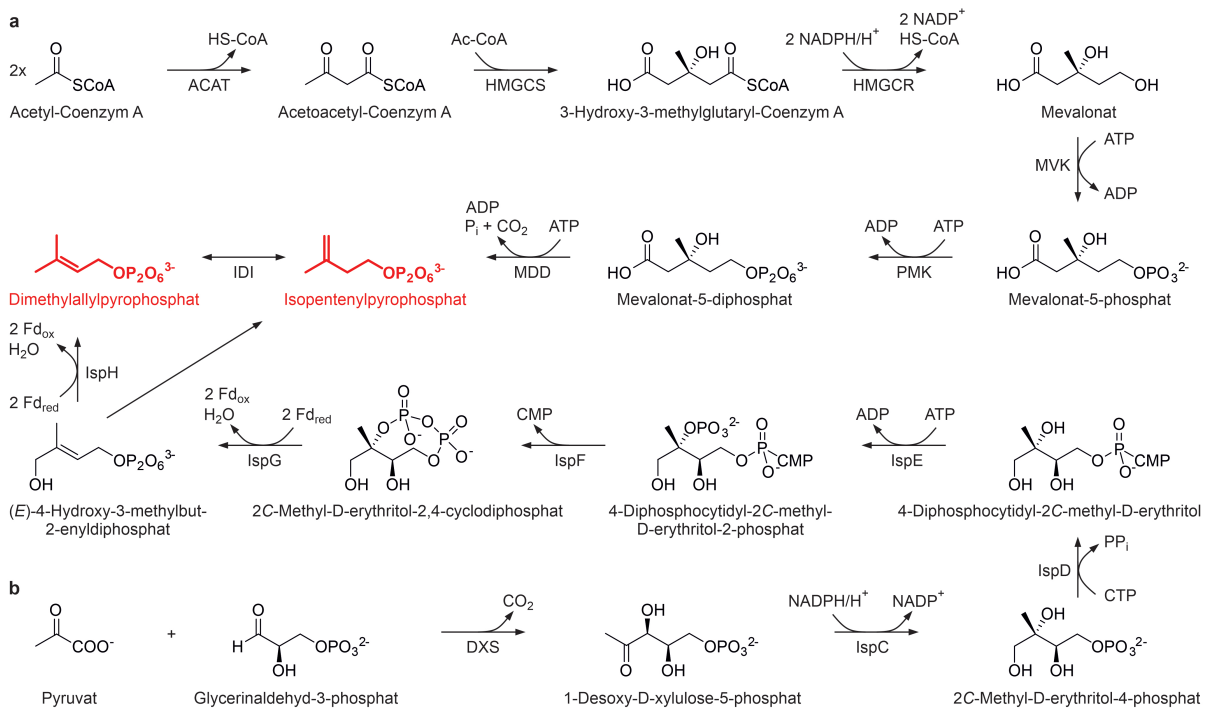


Abbildung 1. Die Synthese von DMAPP und IPP über den MVA-, bzw. MEP-Weg. **a**, Der MVA-Weg beginnt mit der Reaktion von insgesamt drei Molekülen Acetyl-CoA zu HMG-CoA, welches zu Mevalonat reduziert und anschließend zweifach phosphoryliert wird. Durch Decarboxylierung entsteht schließlich der C₅-Baustein IPP, welcher abhängig vom Bedarf der Zelle enzymatisch in DMAPP isomerisiert werden kann. Die beteiligten Enzyme sind: Acetoacetyl-CoA-Synthase (ACAT), HMG-CoA-Synthase (HMGCS), HMG-CoA-Reduktase (HMGCR), Mevalonatkinase (MVK), Phosphomevalonatkinase (PMK), Mevalonat-diphosphatdecarboxylase (MDD), sowie Isopentenylidiphosphatisomerase (IDI). **b**, Alternativ dazu entsteht im MEP-Weg durch Kondensation von Pyruvat und GAP erst DXP, welches zu MEP umgesetzt wird. Durch Übertragung eines Nukleotids auf die Phosphat-, sowie der Phosphorylierung der tertiären Hydroxygruppe, bildet sich CDP-MEP, das unter Abspaltung von CMP zyklisiert. Unter Reduktion durch Fe-S-Katalyse bilden sich daraus erst HMBPP und anschließend sowohl DMAPP als auch IPP. Die beteiligten Enzyme sind: DXP-Synthase (DXS), MEP-Synthase (IspC), Cytidindiphosphat-Methylerythritol-Synthase (IspD), Cytidyl-Methyl-Kinase (IspE), Methyl-Erythritol-Cyclodiphosphat-Synthase (IspF), HMBPP-Synthase (IspG), HMBPP-Reduktase (IspH).

1.1.2. Kettenverlängerung der Isoprenyldiphosphate

DMAPP und IPP dienen als alleinige Substrate zur Synthese sämtlicher Isoprenyldiphosphate. Aufgrund der Phosphorylierung beider Verbindungen erfolgen die enzymatischen Kettenverlängerungen durch Isoprenyldiphosphatsynthasen (IDS) energieunabhängig. Die erste Reaktion, welche hauptsächlich in GPP- (GPPS) und FPP-Synthasen (FPPS) stattfindet, beginnt mit der metallabhängigen Koordinierung von DMAPP. Das häufigste Metallion ist hierbei Mg²⁺, aber auch andere zweiwertige Metallionen wie Mn²⁺ und Co²⁺ sind effiziente Katalysatoren. Die Metalle werden durch die zahlreichen Aspartatreste des ersten (FARM) und zweiten asparaginsäure-reichen Motivs (SARM) der IDS koordiniert und umschließen die Pyrophosphat-Gruppe des allylischen Substrats (PP_{Al}). Dieser Bereich des aktiven Zentrums wird als allylische (Al-)Bindestelle bezeichnet und aktiviert PP_{Al} als Abgangsgruppe durch Auffangen der zusätzlichen negativen Ladung des freigewordenen Pyrophosphats (PP_i). Die Ionisation der C-O-Bindung wird besonders durch die Allylgruppe begünstigt, welche das entstehende Carbokation delokalisiert und über die tertiäre Kohlenstoffposition 3 stabilisiert.

Das Fehlen dieses Effekts im isomeren Edukt IPP verhindert die Abspaltung der PP-Gruppe, sollte dieses in die Al-Stelle binden.^{13,14}

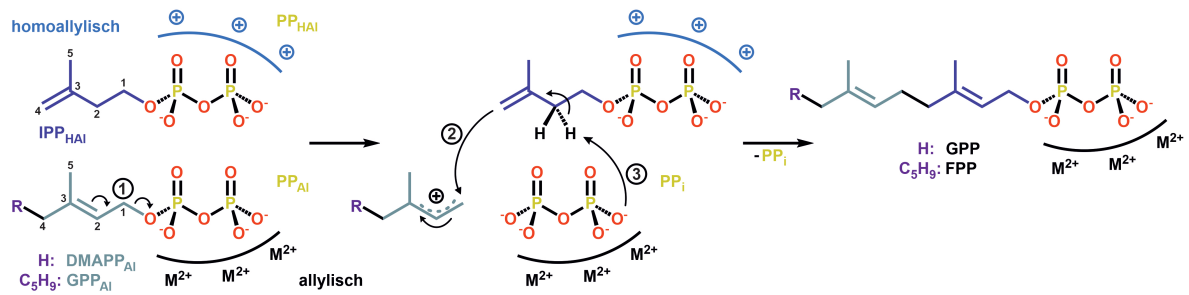


Abbildung 2. Der Reaktionsmechanismus in IDS. In dieser Enzymklasse beginnt die Katalyse mit einem in die allylische Stelle gebundenen (Al) Prenylsubstrat (z.B. DMAPP oder GPP). Ein Cluster aus drei zweiwertigen Metallionen umgibt die Pyrophosphatgruppe (PP_{Al}) und erleichtert die Ionisierung der Esterbindung (1). Basische Reste der homoallylischen Bindestelle (HAI) koordinieren IPP, welches das entstehende Carbokation am C_1 der Prenylgruppe angreift (2). Das entstehende Pyrophosphat (PP_i) deprotoniert am C_2 des Intermediats (3) und stellt die Allylgruppe im verlängerten Metaboliten (GPP oder FPP) wieder her. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

Damit die Reaktion ablaufen kann, muss IPP stattdessen an seine Spezifitätsstelle binden, die sich aus basischen Aminosäureseitenketten bildet (Abb. 2). Diese homoallylische (HAI) Bindetasche positioniert die terminale C-C-Doppelbindung in unmittelbare Nähe des generierten Carbokations und erlaubt einen nukleophilen Angriff auf die C_1 -Position der allylischen Prenyleinheit. Die Orientierung des IPP-Moleküls ist hierbei wesentlich für die stereochemische Selektivität der Reaktion und spezifisch für *E*- und *Z*-IDS.¹⁶ Das abgespaltene PP_i in der Al-Stelle agiert daraufhin als Brønsted-Base und abstrahiert ein Proton von C_2 des elongierten Produkts. Nach der Reaktion ist die PP-Einheit des entstehenden GPP-Moleküls in der HAI-Bindestelle verankert (PP_{HAI}) und kann, sofern das Enzym dies ermöglicht, nach Freisetzung von PP_i selbst in die FARM-Region binden und mit einer weiteren IPP-Einheit zu FPP reagieren. Alle weiteren Kettenverlängerungen erfolgen nach demselben konservierten Prinzip, wobei alle Synthasen, deren Produkte C_{30} - oder längere Prenyleinheiten aufweisen, ausschließlich FPP als allylisches Vorläufersubstrat einsetzen, während DMAPP der Gruppe der scIDS vorbehalten ist (Abb. 3).¹⁷ Während die kurzkettigen Produkte der scIDS überwiegend in die Biosynthese von Steroiden, Retinoiden oder Chlorophyllen eingehen, ist in der Synthese von Naturkautschuk auch eine Verkettung von über 5000 Isopreneinheiten möglich.

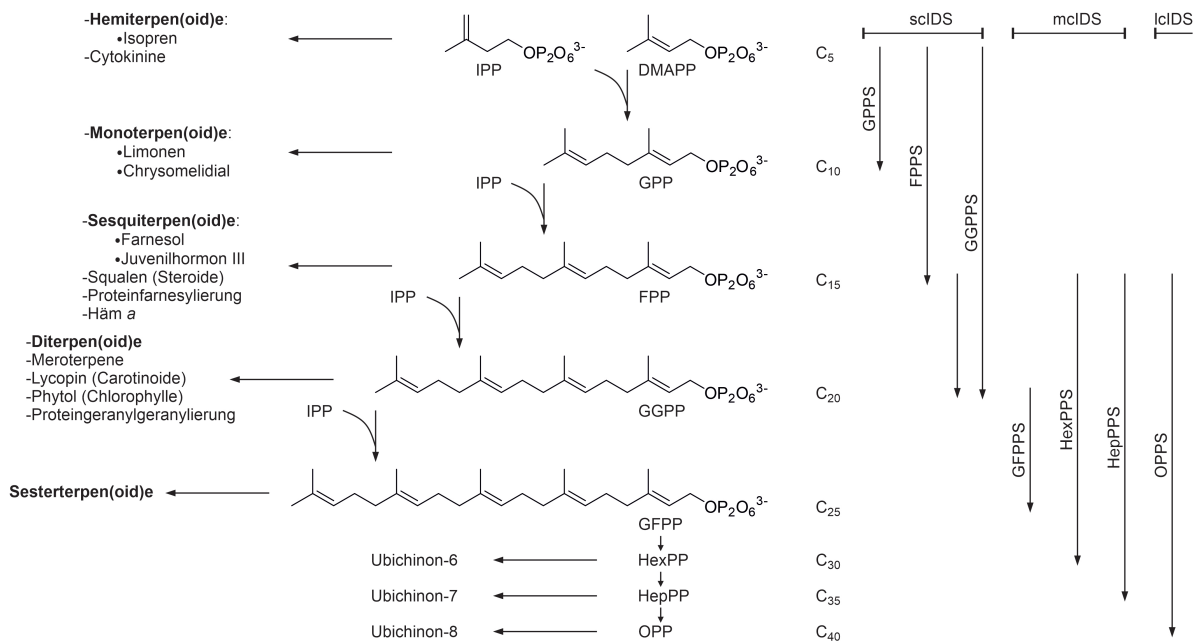


Abbildung 3. Die Biosynthese der Isoprenyldiphosphate. In jedem Schritt wird der Prenylrest durch ein IPP-Molekül um eine C₅-Einheit verlängert. Gleichzeitig dienen die einzelnen Zwischenstufen als Substrate für Terpene und Terpenoide. Katalysiert werden die Reaktionen durch kurzketige (sc, C₁₀-C₂₀), mittelkettige (mc, C₂₅-C₃₅) und langkettige (lc, ab C₄₀) IDS,¹⁸ die, bis auf wenige Ausnahmen, DMAPP oder FPP als Ausgangssubstrat nutzen. Weitere Produkte sind: Geranylgeranyl-PP (GGPP), Geranylarnesyl-PP (GFPP), Hexaprenyl-PP (HexPP), Heptaprenyl-PP (HepPP) und Octaprenyl-PP (OPP).

1.1.3. Phylogenetische Entwicklung der IDS

Bei den bislang identifizierten IDS zeigt sich ein hoher Verwandtschaftsgrad und eine gemeinsame Proteinfaltung über alle Domänen des Lebens (Abb. 4). IDS treten am häufigsten als Homodimer mit zwei aktiven Zentren auf, allerdings sind auch Fälle von Heterodimerisierung bekannt, in denen lediglich eine Untereinheit katalytische Aktivität aufweist.¹⁹⁻²¹ Die Interaktion der Dimerpartner ist in beiden Fällen essenziell für die enzymatische Aktivität und direkt an der Bildung eines zentralen Substratkanals beteiligt.²²

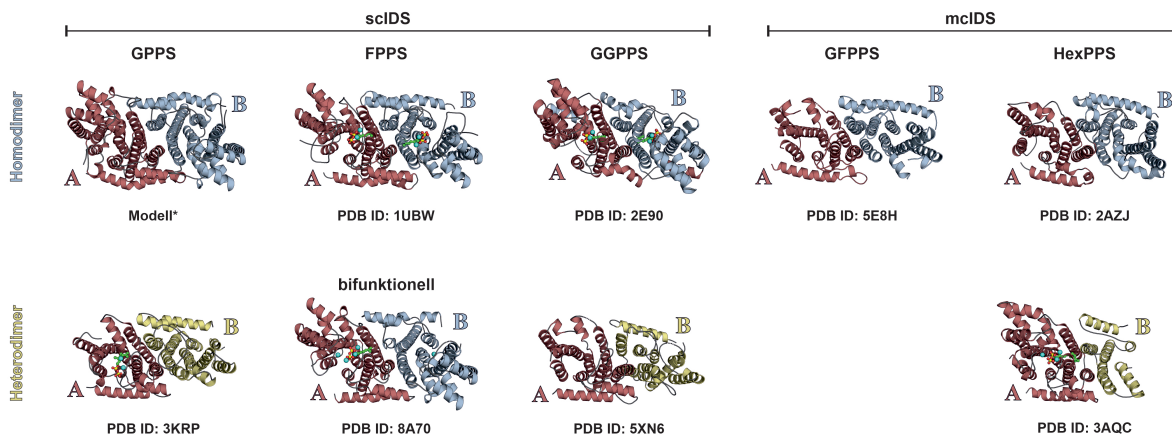


Abbildung 4. Die konservierte Architektur der kurz- und mittelkettigen IDS. Die beiden Untereinheiten sind jeweils rot-blau (Homodimer) oder rot-gelb (Heterodimer) eingefärbt. Die homodimere, bifunktionelle FPPS aus dieser Arbeit stellt dabei einen Sonderfall dar. Im heterodimeren Fall kann jeweils nur Untereinheit A Substrat oder Produkt binden. Die bislang nicht strukturell charakterisierte GPPS aus *Ips pini* wurde mit ColabFold modelliert,^{23,24} für alle anderen Strukturen ist die PDB ID angegeben.^{20,21,25-29}

Unter den zahlreichen, hoch konservierten Sequenzmotiven finden sich unter anderem das FARM sowie SARM mit der jeweiligen Konsensussequenz DDxxD. Klassifiziert man IDS anhand ihres Produktspektrums und phylogenetischer Verwandtschaft, zeigen sich insbesondere in der Architektur des FARM auffällige Übereinstimmungen (Abb. 5). Aus diesem Grund werden die fünf N-terminalen Aminosäurepositionen vor dem FARM zusammen mit diesem als kettenlängenbestimmende Region (chain-length determination, CLD) bezeichnet.

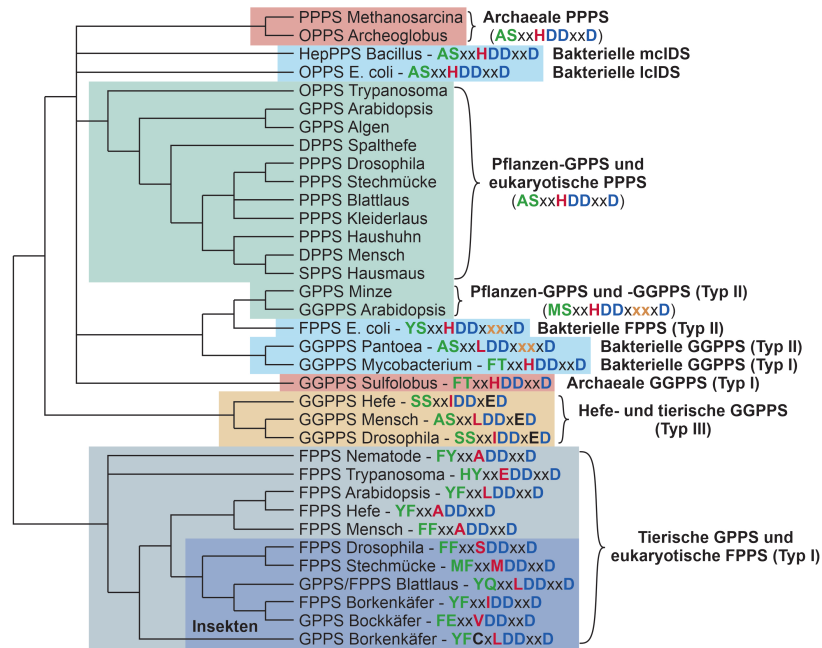


Abbildung 5. Phylogenetischer Baum der IDS zwischen verschiedenen Domänen des Lebens. Die Konsensussequenz DDx(xx)xD des FARMs ist blau markiert, die entscheidenden Positionen -4 und -5, sowie -1 der CLD-Region sind grün, bzw. rot eingefärbt. Die GPPS der Borkenkäfers *Ips pini* weist zusätzlich einen untypischen Cysteinrest an Position -3 auf. Sequenzen übernommen von und Darstellung in Anlehnung an Vandermoten et al.³⁰

Ausgehend von einem gemeinsamen Vorläufer, vermutlich einer archaellen GGPPS, stellt die Entwicklung der eukaryotischen FPPS (Typ I) den markantesten Abzweigungspunkt dar. Diese Enzymklasse weist an Position -1 vor dem FARM eine deutliche Varianz gegenüber dem ansonsten konservierten Histidin auf. Man geht davon aus, dass für die Selektion von FPP als Endprodukt insbesondere aromatische Aminosäuren an den Positionen -4 und -5 eine Rolle spielen, welche die Aufnahme längerer Substrate als GPP unterbinden.^{25,31,32} Ebenfalls eng verwandt mit Typ I FPPS ist eine Gruppe tierischer, bislang ausschließlich in Insekten identifizierter GPPS, sowie bifunktionelle Enzyme, die selektiv C₁₀- und C₁₅-Einheiten produzieren können. Wie die Produktspezifität dieser Enzyme erreicht wird, bleibt bislang unverstanden.

Die verzweigte Evolution der IDS zeigt sich unter anderem in FPPS (Typ II) welche ausschließlich in Bakterien vorkommen. Diese besitzen eine zusätzliche Insertion im DDxxD-Motiv, die sie sowohl mit Typ II GGPPS, sowie GPPS aus Pflanzen gemein haben. Des Weiteren lässt sich für sämtliche GGPPS (Typ I-III) beobachten, dass mit zunehmender

Kettenlänge des Produkts, die Prävalenz aromatischer Seitenketten an Positionen -4 und -5 in der CLD-Region abnimmt, was die Aufnahme von FPP als Substrat erlaubt.

Für die Synthese von Isoprenyldiphosphaten ab einer Länge von C₂₅ durch mittelkettige IDS (mcIDS) und langkettige IDS (lcIDS) scheint die CLD-Region keine übergeordnete, regulatorische Funktion mehr zu erfüllen und weist eine streng konservierte Abfolge auf (ASxxHDDxxDD). Stattdessen ergibt sich hier die maximale Länge des Endprodukts aus sterischen Einschränkungen durch Seitenketten, die tiefer im Substratbindekanal sitzen.²⁸

1.1.4. Die Rolle von GPP und FPP im Insekten-Stoffwechsel

Der Lebenszyklus von Insekten beinhaltet umfassende metamorphische Veränderungen in sehr eingegrenzten Zeitspannen, die sich stark an äußeren Einflüssen orientieren. Gleichzeitig stehen sie in dauerhafter Konkurrenz zu ihrer Umwelt, sei es durch Fraßfeinde, Kommunikation mit Artgenossen oder Konkurrenz um Nahrungsquellen. Für ihre Entwicklung nutzen Insekten Juvenilhormone auf Basis von FPP, welches durch scIDS unter anderem im Fettkörper-Organ über den Mevalonatweg synthetisiert wird (Abb. 1a). Während ein Großteil des FPPs in Eukaryoten normalerweise zu Cholesterin verstoffwechselt wird, findet dessen *de novo* Synthese in Insekten nicht statt und FPP steht z.B. der Produktion von Juvenilhormon III in endokrinen Drüsen wie dem Corpus allatum zur Verfügung.^{33,34} Diese Hormone regulieren grundlegend den Übertritt vom Larvenstadium in die Verpuppung, beeinflussen aber auch die Ausprägung des Phänotyps, die Entwicklung geschlechtsspezifischer Merkmale und die Kommunikation über Pheromone.³⁵ Zumeist löst hierbei ein Absinken der Hormonlevel die Verpuppung aus, während eine gleichbleibend hohe Konzentration das Durchlaufen der verschiedenen Larvenstadien ermöglicht.³⁶

Während der Synthese von FPP durch FPPS entsteht GPP als Zwischenprodukt, welches aber gleichzeitig als Vorläufer der Monoterpene dient. Terpene dieser Klasse finden sich überwiegend in ätherischen Ölen von Pflanzen, spielen aber ebenfalls eine entscheidende Rolle als Abwehrstoffe und Pheromone vieler Insektenarten.³⁷⁻³⁹ Der Meerrettichblattkäfer *Phaedon cochleariae*, der häufig als Schädling in Land- und Forstwirtschaft auftritt,⁴⁰ produziert während seines gesamten Larvenstadiums sogenannte Iridoide. Hierbei handelt es sich um zyklische Monoterpene, die überwiegend als pflanzliche Bitterstoffe bekannt sind, aber auch von Insekten zur Abwehr von Fressfeinden eingesetzt werden.⁴¹ *P. cochleariae* synthetisiert hierzu unter anderem Chrysomelidial in seinen Drüsenreservoirs und setzt dieses als Bestandteil von Abwehrsekreten bei externer Stimulation frei (Abb. 6 linkes Foto). Zur *de novo* Synthese von Chrysomelidial wird GPP im Fettkörper des Käfers zu Geraniol (**1**) dephosphoryliert und anschließend zu 8-Hydroxygeraniol (**2**) hydroxyliert.⁴² Diese Verbindung weist eine inhibitorische Wirkung auf die enzymatische Aktivität der HMG-CoA-Reduktase (HMGCR) auf und beeinflusst somit den gesamten Isoprenoid-Stoffwechsel.^{43,44} Die anschließende Umwandlung zu 8-Hydroxygeraniol-Glykosid (**3**) erlaubt den Transport des Vorläufermoleküls in der Hämolymphe zu den Drüsenreservoirs, in denen Chrysomelidial synthetisiert und gespeichert wird.⁴⁵ Bemerkenswerterweise kann diese Verbindung auch mit der Nahrung aus exogenen Quellen aufgenommen werden, was die Homöostase und Versorgung der Verteidigungsdrüsen gewährleistet.

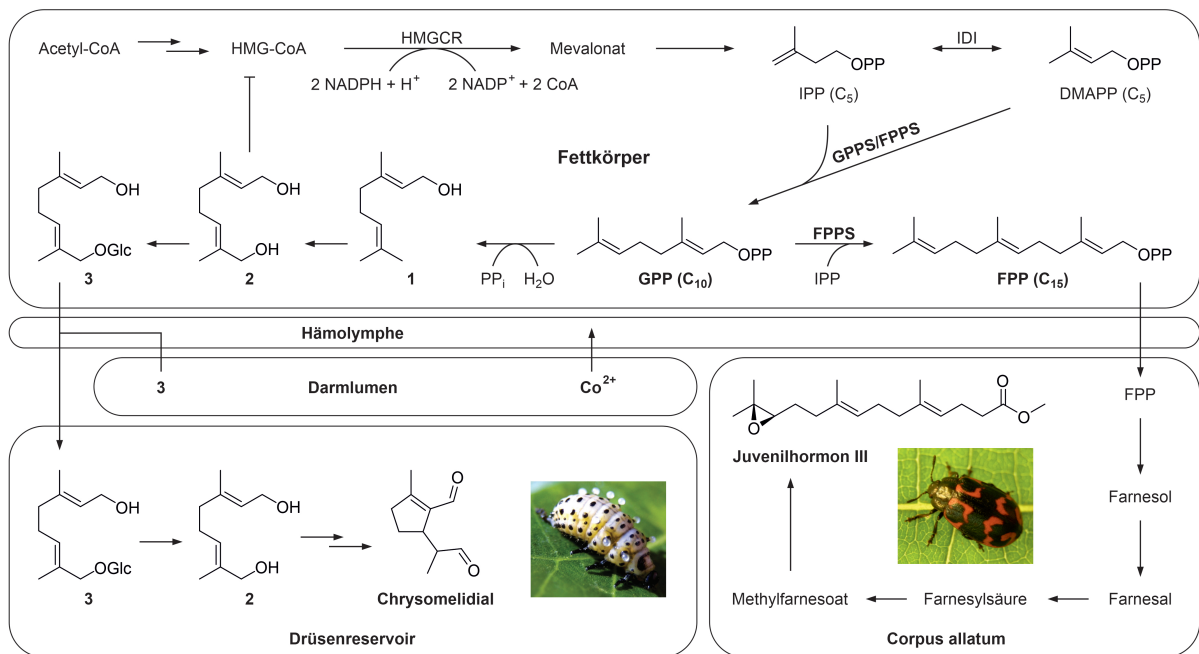


Abbildung 6. Biosynthesewege von GPP und FPP in Insekten. Darstellung in Anlehnung an Frick et al.² Fotos einer *Chrysolida populi* Larve (links), sowie eines adulten *Chrysolida lapponica* Käfers wurden von Prof. Dr. Wilhelm Boland (MPI, Jena) zur Verfügung gestellt.

Der Isoprenyl-Stoffwechsel der Insekten ist also darauf angewiesen, dass stets ausreichend GPP sowie FPP zur Verfügung steht. Gleichzeitig wird der Bedarf maßgeblich durch das jeweilige Entwicklungsstadium und die vorhandene Nahrungsquelle beeinflusst. Dennoch wurde bislang nur ein einziger tierischer Vertreter einer spezifischen GPPS genauer identifiziert, nämlich im Borkenkäfer *Ips pini*,²⁴ während Pflanzen zur spezifischen Anreicherung von GPP häufig über selektive Enzyme verfügen.²⁰ In vielen Insekten finden sich stattdessen FPPS, die neben FPP zusätzlich ausreichende Mengen an GPP für die Monoterpen-Biosynthese bilden.⁴⁶⁻⁴⁹ Hierbei wird die duale Aktivität maßgeblich durch die Konzentration von IPP und DMAPP beeinflusst und GPP durch Umwandlung in Monoterpene der Weiterreaktion zu FPP entzogen. Allerdings konnten bereits zusätzliche Regulationsmechanismen identifiziert werden, die das Produktspektrum zwischen GPP und FPP in Abhängigkeit der Konzentration zweiwertiger Metallionen verschieben.^{2,50}

1.1.5. Metallregulation im Insektenstoffwechsel

In Larven von *P. cochleariae* wurde eine IDS (*PcIDS1*) charakterisiert, die sowohl GPP als auch FPP produziert, und zwar selektiv in Abhängigkeit der zur Verfügung stehenden Metallionen.² Unter physiologischen Konzentrationen von Mg^{2+} und ausreichenden Mengen an IPP, erfolgt die Kettenverlängerung bis FPP (82 % und 18 % GPP). Sobald Schwermetallionen (SMI) wie Mn^{2+} oder Co^{2+} zugegen sind, wird selbst bei 100-fachem Mg^{2+} -Überschuss *in vitro* fast ausschließlich GPP synthetisiert (96 % und 4 % FPP). Das Enzym findet sich zudem zu einem überwiegenden Teil im Fettkörper der Larven und ist dort maßgeblich an der Synthese von GPP beteiligt. In anderen Organen hingegen spielt die FPP-Synthese eine wesentlichere Rolle, was sich möglicherweise mit einer gezielten Homöostase durch SMI-Transporter erklären lässt.⁵¹ Obwohl die absoluten Mengen von Mn^{2+} und Co^{2+} um Faktoren von 1:300, bzw. 1:20.000 hinter der konstant hohen Mg^{2+} -Konzentration zurückbleiben, könnte eine lokale

Erhöhung der SMI-Level das Produktspektrum von *PcIDS1* somit maßgeblich beeinflussen. In Übereinstimmung mit früheren Studien zeigt sich außerdem, dass SMI die Reaktion im Allgemeinen beschleunigen und die Affinität für DMAPP als Substrat signifikant erhöhen.⁵²

1.2. Die Merosterolsäure-Synthase MstE

1.2.1. Die biologische Rolle zyklischer Triterpene

Gemeinsam mit den Juvenilhormonen, die durch direkte Modifikation von FPP entstehen, regulieren terpenoide Ecdysteroide die Häutungsvorgänge der Insekten während aller Entwicklungsstadien zum geschlechtsreifen, adulten Tier und übernehmen anschließend wichtige Rollen während der Fortpflanzung sowie Eiablage.^{53,54} Diese Verbindungen können nur aus mit der Nahrung aufgenommenen Cholesterin und Phytosterinen synthetisiert werden und ähneln in Aufbau und Funktion den Steroidhormonen der Wirbeltiere.⁵⁵ All diese Naturstoffe besitzen einen tetrazyklischen steroiden Aufbau (Ringe A-D) und leiten sich vom Triterpen Lanosterin, bzw. in Pflanzen von Cycloartenol ab (Abb. 7). Neben ihrer Aufgabe als membrangängige Signalüberträger, sind Steroide in allen Organismen wesentliche Bestandteile der Membranen und beeinflussen maßgeblich deren Zusammensetzung, Viskosität und Durchlässigkeit.⁵⁶ Die Cholesterinbiosynthese ist somit direkt oder indirekt ein essenzieller Stoffwechselweg für alle Eukaryoten, konnte aber inzwischen auch in vielen Bakterienstämmen nachgewiesen werden.⁵⁷ Eine ebenso wichtige Rolle, insbesondere in vielen Pflanzen, Pilzen und Prokaryoten übernehmen Hopanoide, Derivate des Hopan-Grundgerüsts, welches im Vergleich zu Lanosterin einen zusätzlichen Cyclohexanring aufweist (Abb. 7).

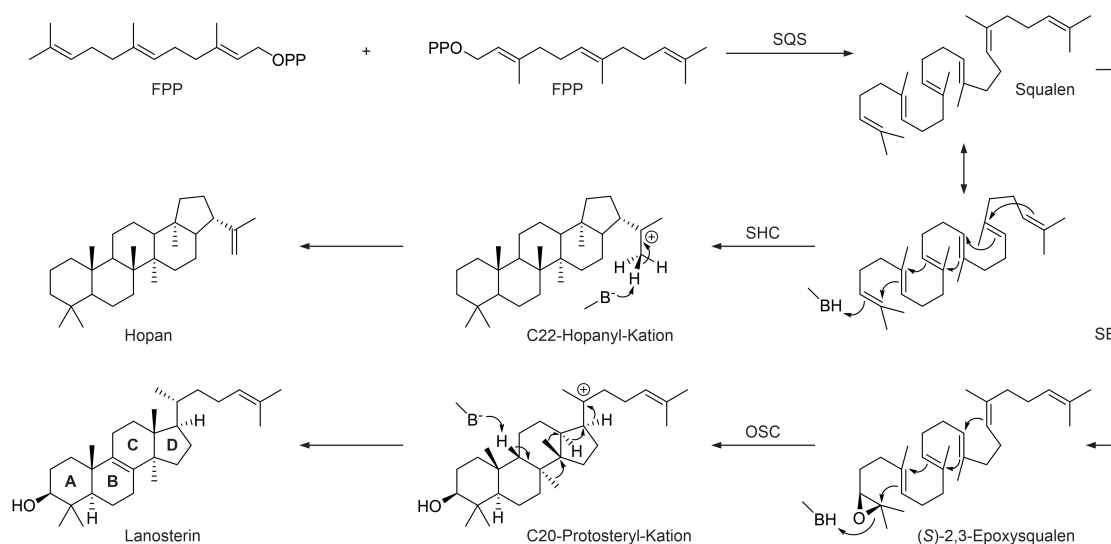


Abbildung 7. Biosynthese von Hopan und Lanosterin ausgehend von zwei Molekülen FPP. SQS (Squalensynthase), SE (Squalenepoxidase), SHC (Squalen-Hopen-Cyclase), OSC (Oxidosqualensynthase). Das charakteristische Grundgerüst der Steroide ist mit A-D gekennzeichnet.

Die Squalensynthase katalysiert den ersten Schritt in der Biosynthese der zyklischen Triterpene, indem sie zwei FPP-Moleküle reaktiv zu Squalen kondensiert.⁵⁸ Dieses kann direkt vom mit aromatischen und hydrophoben Seitenketten ausgekleideten Substratbindekanal der Squalen-Hopen-Cyclase (SHC) aufgenommen werden.⁵⁹ Dort wird die Zyklisierung durch Protonierung der terminalen Squalen-Doppelbindung ausgelöst, welche eine Kaskade von Carbokation-

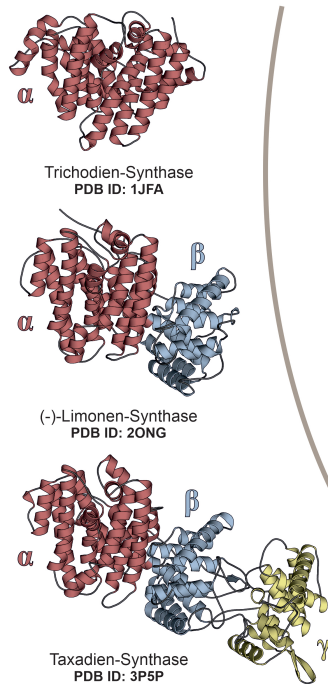
Intermediaten erzeugt, die mit den π -Elektronen der jeweils nächstgelegenen Doppelbindung reagieren.^{60,61} Da diese Polyzyklisierung über kurzlebige Intermediate nahezu konzertiert stattfindet, ist die Vororientierung von Squalen durch die SHC maßgeblich für die Stereoselektivität des Produkts.^{62,63} Im Falle des C22-Hopanyl-Kations, welches entweder durch Deprotonierung in Hopan oder durch Wasseraddition in Diplopterol übergeht,⁶³ befinden sich alle Cyclohexanringe in der Sesselkonformation (all-chair-Konfiguration).

Obwohl die Oxidosqualen-Synthasen (OSC) strukturell eng mit den SHC verwandt sind und sich wohl ausgehend von einem gemeinsamen Vorfahren divergent entwickelt haben.⁶⁴⁻⁶⁶ bedarf es zur Synthese von Lanosterin einer zusätzlichen Squalenepoxidase (SE). OSC bindet ausschließlich (*S*)-2,3-Epoxysqualen und initiiert die Zyklisierungskaskade durch Protonierung und Ringöffnung des terminalen Epoxids. Im Gegensatz zu Hopan, bilden sich lediglich drei Cyclohexan-, sowie ein Pentanring und das C20-Protosteryl-Kation weist eine chair-boat-chair-Konfiguration auf. Eine erneute Deprotonierung löst daraufhin die Einführung einer Doppelbindung sowie mehrere Umlagerungsreaktionen aus, wodurch schließlich Lanosterin entsteht.⁶⁷

1.2.2. Die Evolution der Terpenyclasen

Wie sich sowohl an Steroiden und Hopanoiden, aber auch im Falle von Chrysomelidial zeigt,³⁹ werden Isoprenoide häufig in eine zyklische Form überführt, um neue Stereozentren und C-C-Bindungen einzuführen, die eine hochgradige Anpassung an spezifische, zelluläre Funktionen ermöglichen.⁶⁸ Die Gruppe der dafür verantwortlichen Terpensynthasen (TPS), zu denen auch SHC und OSC zählen, teilt man grundsätzlich danach auf, wie das reaktive Carbokation-Intermediat generiert wird. TPS der Klasse I (TPSI) verfügen ähnlich wie IDS über ein DDxxD (oder DDxxE) Motiv und binden damit einen trinuklearen Metallionencluster, der die heterolytische Abspaltung der Pyrophosphateinheit des Prenylsubstrats ermöglicht.^{69,70} Im Gegensatz zu IDS, die wenig Varianz untereinander aufzeigen, unterscheiden sich TPSI trotz der gemeinsamen α -helikalen Faltung (α -Domäne) meist deutlich in ihrer Struktur und weisen nur geringe Sequenzidentität auf.^{71,72} Während IDS erst durch Dimerisierung ihre Spezifität in der A1-Stelle aufbauen, liegen TPSI häufig als aktive Monomere vor, was eine weitere Diversifizierung des Produktspektrums ermöglicht.^{73,74} TPSI in Form von Mono- oder Homodimeren aus einer einzigen α -Domäne sind dabei fast ausschließlich für die Synthese von Sesqui- und Diterpenen in Bakterien und Pilzen verantwortlich (Abb. 8).^{69,75-77}

Klasse I Terpencyclasen (TPSI)



Klasse II Terpenyclasen (TPSII)

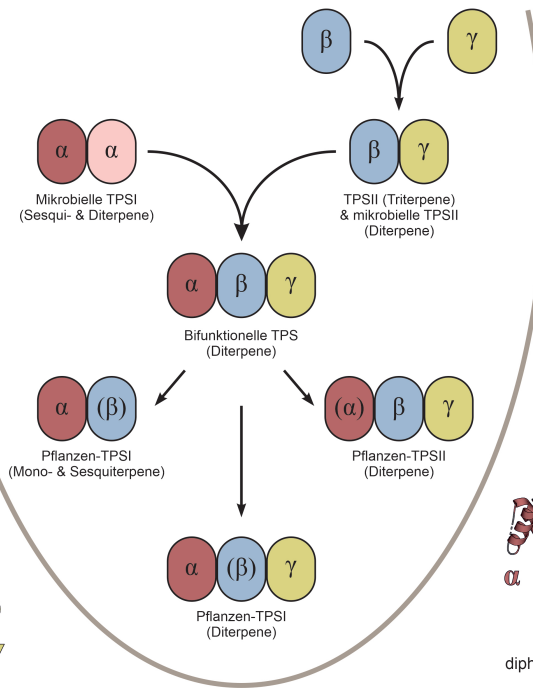
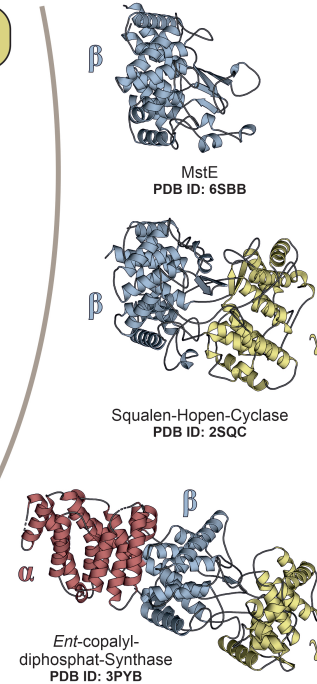


Abbildung 8. Architektur und Evolution der Terpenyclasen. Die verschiedenen Strukturdomänen sind rot (α -Domäne, helikale IDS-Faltung), blau (β -Domäne, α_6 - α_6 -Fass), sowie gelb (γ -Domäne, α_6 - α_6 -Fass, inaktiv) eingefärbt. Das mittige Schema skizziert die evolutionäre Entwicklung der TPS, ausgehend von mono-, bzw. dimeren α -TPSI und $\beta\gamma$ -TPSII. MstE, die in dieser Arbeit behandelte TPS, stellt dabei einen Vorläufer der bekannten $\beta\gamma$ -Architektur dar. Für alle beispielhaft gezeigten Strukturen der TPSI (links) und TPSII (rechts) ist die PDB ID angegeben.^{75,78-82} Darstellung in Anlehnung an Moosmann et al.⁸²

Die zweite Klasse der TPS (TPSII) erzeugt das reaktive Carbokationintermediat stattdessen durch Protonierung einer meist terminalen Doppelbindung oder Epoxidgruppe.⁸³ Das aktive Zentrum dieser Enzyme befindet sich hierbei im Interface zwischen der β - und γ -Domäne. Beide Domänen zeichnen eine runde Fassetstruktur mit sechs innen, sowie sechs außen liegenden α -Helices aus (α_6 - α_6). Im Zentrum der β -Domäne befindet sich das konservierte DxD(D)-Motiv, das über ein Proton-Relais als Brønsted-Säure aktiviert wird.^{61,63} Die vermutlich aus einer Genduplikation entstandene γ -Domäne ist hingegen nicht-katalytisch, aber maßgeblich für die Substratbindung und die Verankerung in der Zellmembran verantwortlich. Somit zählen alle TPS mit einer γ -Domäne zu den monotopischen Membranproteinen, was insbesondere bei den Triterpenyclasen mit dem hydrophoben Charakter ihrer Substrate und Produkte korreliert.^{84,85}

Man geht inzwischen davon aus, dass im Laufe der Evolution unter den $\beta\gamma$ -TPSII zuerst bakterielle Diterpensynthasen entstanden, welche anschließend mit α -TPSI zu einer $\alpha\beta\gamma$ -Architektur verschmolzen sind.^{86,87} Diese bifunktionellen Enzyme finden sich ausschließlich in Pflanzen und nutzen die Aktivität beider aktiver Zentren um komplexe Diterpene zu synthetisieren.⁸⁸ Im weiteren Evolutionsverlauf haben sich hieraus wiederum $\alpha\beta\gamma$ -TPS entwickelt, die selektive Klasse-I- oder II-Aktivität aufweisen und deren passivierte Domänen überwiegend der Proteinfaltung und Substratbindung dienen.⁸⁹ Mono- und Sesquiterpensynthasen haben sich schließlich der γ -Domäne entledigt und entsprechen einer $\alpha\beta$ -Struktur mit Klasse-I-Aktivität.^{79,90,91}

1.2.3. Meroterpencyclasen als Vorläufer der $\beta\gamma$ -Architektur

Im Gegensatz zur α -Domäne, die ihr Substrat eigenständig umschließt und somit unerwünschten Nebenreaktionen vorbeugt,⁶⁹ konnte bislang kein TPSII-Vorläufer charakterisiert werden, der lediglich aus einer aktiven β -Domäne besteht. Allerdings wurde kürzlich in der Merosterol-Biosynthese des Cyanobakteriums *Scytonema* sp. PCC 10023 das Enzym MstE identifiziert, dessen Sequenz Ähnlichkeit zur β -Domäne von Triterpencyclasen aufweist.⁴ MstE ist Teil eines umfangreichen Genclusters und katalysiert die Reaktion von 5-Geranylgeranyl-3,4-dihydroxybenzoat zu Merosterolsäure A, dem Vorläufer von Merosterol A (MA, Abb. 9). MA zählt zu den Meroterpenen, steroidartigen, oft stark modifizierten Naturstoffen, die man in zahlreichen Tiefseeorganismen findet und deren Ursprung häufig in symbiotischen Cyanobakterien vermutet wird.^{92,93}

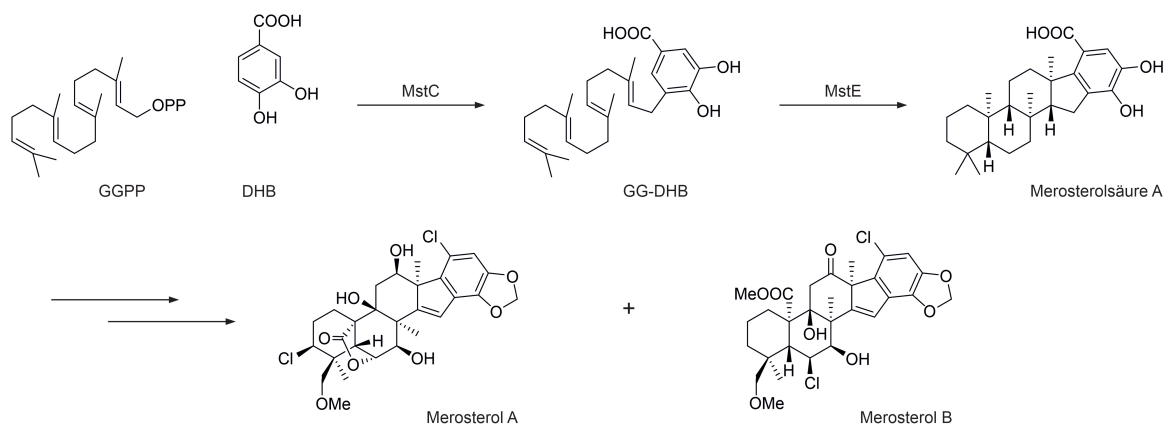


Abbildung 9. Biosynthese von Merosterolen in *Scytonema*. MstC überträgt GGPP auf einen 3,4-Dihydroxybenzoat-Rest (DHB), woraufhin das ubichinon-ähnliche Substrat durch MstE zu Merosterolsäure A, dem Vorläufer verschiedener Merosterole, zyklisiert wird. Darstellung in Anlehnung an Moosmann et al.⁴

2. Aufgabenstellung

Die Terpenbiosynthese in der Natur stellt eine nahezu unerschöpfliche Quelle an Reaktions- und Regulationsmechanismen, individuellen Proteinfaltungen, sowie Molekülstrukturen dar. Trotz dieser Vielfalt gehen alle Terpene und Terpenoide auf eine kleine Zahl an Vorläufermolekülen zurück, deren Synthese mit DMAPP und IPP beginnt. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wilhelm Boland vom Max-Planck-Institut für Chemische Ökologie in Jena sollte hierzu der Regulationsmechanismus des metallabhängigen Enzyms *PcIDS1* aus dem Blattkäfer *Phaedon cochleariae* aufgeklärt werden. Trotz hoher Sequenzidentität zu bekannten Proteinstrukturen, war die Zielsetzung, *PcIDS1* durch systematische Kristallisationsexperimente, sowie biophysikalische Methoden zu charakterisieren. Dies gelang durch umfassende Thermal Shift Assays in Kombination mit insgesamt 15 Komplexstrukturen in Anwesenheit verschiedener Metallionen, Substrate und Inhibitoren. Ein Manuskript mit dem Titel „Metal-dependent enzyme symmetry guides the biosynthetic flux of terpene precursors“ wurde hierzu zur Veröffentlichung eingereicht.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie beschreibt die Biosynthese von Merosterolsäure A, einem polyzyklischen Meroterpen.⁴ Dieses Produkt der bakteriellen Terpenocyclase MstE kann wiederum in stark modifizierte Naturstoffe mit antimikrobiellen Wirkmechanismen umgewandelt werden. Erstaunlicherweise ähnelt die Primärsequenz von MstE der bislang bekannten Architektur der Terpenocyclasen nur wenig und scheint lediglich aus einer einzigen Domäne zu bestehen, die in *Scytonema*, einer Klasse von Cyanobakterien, im Cytosol aktiv ist. Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit war die strukturelle Charakterisierung dieses Enzyms und Aufklärung des Reaktionsmechanismus durch ortsgerichtete Mutagenese. Parallel dazu sollten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jörn Piel vom Institut für Mikrobiologie der ETH Zürich Aktivitätsstudien durchgeführt werden. Tatsächlich gelang es im Laufe des Projekts insgesamt sechs Kristallstrukturen im Komplex mit Surrogat, Substrat, sowie Produkt bei nahezu atomarer Auflösung zu erhalten. Zusätzlich erlaubte die strukturgeführte Mutagenese die Erstellung von Proteinvarianten, die ein alternatives Endprodukt aufwiesen. Die Ergebnisse der Kooperationsarbeit wurden in der Fachzeitschrift *Nature Chemistry* unter dem Titel „A monodomain type II terpene cyclase assembles complex isoprenoid scaffolds“ veröffentlicht.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Chemikalien

Falls nicht anderweitig angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von folgenden kommerziellen Anbietern bezogen und in ihrer Zusammensetzung und Reinheit nicht verändert:

AppliChem (Darmstadt, DE), Biomol (Hamburg, DE), Merck (Darmstadt, DE), Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Serva (Heidelberg, DE), Roth (Karlsruhe, DE) und VWR (Darmstadt, DE).

3.1.2. Geräte und Zubehör

Tabelle 1. Laborgeräte und Instrumente.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Wasserreinigungsgerät TKA	Teknolabo, Lachiarella, IT
PCR-Thermocycler MyCycler	BioRad, Hercules, USA
Netzteil Elektrophorese EPS 600	Pharmacia Biotech, Uppsala, SWE
Gelfotodokumentation G:Box EF	Syngene, Cambridge, USA
NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Elektroporator MicroPulser mit 2 mm Küvetten	BioRad, Hercules, USA
Thermomixer comfort (für ERG)	Eppendorf, Hamburg, DE
Tischkühlzentrifuge Sigma 1-14K	Sigma, Osterode, DE
Varioklav	HP Medizintechnik, München, DE
Inkubator (für Agarplatten)	Binder, Tuttlingen, DE
Inkubator Infors HT (für Zellanzucht)	Bottmingen, CH
Zelldichtephotometer Ultrospec 10	Amersham Biosciences, Uppsala, SWE
Standzentrifuge Sigma 8K	Sigma, Osterode, DE
Kühlzentrifuge Sigma 4K15	Sigma, Osterode, DE
Branson Digital Sonifier 250	Branson Ultrasonic, Danbury, USA
Hochgeschwindigkeitszentrifuge Sigma 6-16K	Sigma, Osterode, DE
ÄKTA Prime Plus	GE Healthcare, Chicago, USA
ÄKTA Purifier	GE Healthcare, Chicago, USA
Heizblock Techne Dri-Block DB 2A	Bibby Scientific, Stone, UK
Mini-Protean Tetra Cell	BioRad, Hercules, USA
Ika Vibrax VXR	IKA-Werke, Staufen, DE
Kristallisationsroboter Phoenix	Art Robbins Instruments, Sunnyvale, USA

CFX96 RT-PCR	BioRad, Hercules, USA
Kristallisationsroboter Oryx4	Douglas Instruments, Hungerford, UK
Quick Combi Sealer	HJ-Bioanalytik, Mönchengladbach, DE
Rumed Cooled Incubator 3000	Rubarth Apparate, Laatzen, DE
Stereomikroskop SZX10	Olympus, Tokio, JP
UVEX-Mikroskop	JAN Scientific, Seattle, USA
Microlab STARlet	Hamilton, Reno, USA

Tabelle 2. Material und Zubehör.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Cryo Tubes, ERG, Falcon, Glasgefäße, allgemeines Labormaterial	VWR, Darmstadt, DE
Arbeitsstation Agarosegelelektrophorese	Oncor Appligene, Heidelberg, DE
Ultraschallrosette	G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd, DE
HisTrap HP 5 mL	GE Healthcare, Chicago, USA
HiLoad Superdex 200 pg 16/60	GE Healthcare, Chicago, USA
Arbeitsstation SDS-PAGE	BioRad, Hercules, USA
Dialyseschlauch	Roth, Karlsruhe, DE
Amicon Ultra Centrifugal Filter	Millipore, Billerica, USA
96-Well-PCR-Platten mit Verschlussfolie	BioRad, Hercules, USA
Intelli-Plate 3 (96-Well)	Art Robbins Instruments, Sunnyvale, USA
NeXtal Screens	Qiagen, Hilden, DE
Screen 1 pHClear Suite	
Screen 2 pHClear II Suite	
Screen 3 Classics Suite	
Screen 4 Classics II Suite	
Screen 5 JCSG+ Suite	
Screen 8 PEGs Suite	
Screen 9 PEGs II Suite	
CryoLoops, CryoCaps HT, CryoCap HT Vials, CrystalWand Magnetic	Hampton Research, Aliso Viejo, USA
Greifzange für CryoVials, Mikro-Werkzeug	Molecular Dimensions, Newmarket, UK
Schaumstoffdewars	Spearlab, San Francisco, USA
Trockendewar Taylor Wharton CX100	tec-lab, Idstein, DE
Lagerdewar Taylor Wharton HC20	tec-lab, Idstein, DE

3.1.3. Medien

Tabelle 3. Zusammensetzung der Medien.

Bezeichnung	Zusammensetzung
LB-Medium (autoklaviert)	1 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 0,5 % (w/v) NaCl (2 % (w/v) Agar für Agarplatten)
SOC-Medium (sterilfiltriert durch technisches Personal)	2 % (w/v) Pepton 0,5 % (w/v) Hefeextrakt 20 mM Glukose 10 mM MgSO ₄ 10 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 2,5 mM KCl

3.1.4. Molekularbiologische Reagenzien

Tabelle 4. Kits und Referenzstandards.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Plasmid Miniprep Kit I, peqGOLD	VWR Peqlab, Darmstadt, DE
Gel Extraction Kit, peqGOLD	VWR Peqlab, Darmstadt, DE
Cycle-Pure Kit, peqGOLD	VWR Peqlab, Darmstadt, DE
DNA-Leiter Mix, peqGOLD	VWR Peqlab, Darmstadt, DE
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent, St. Clara, USA
Unstained Protein Standard 10-200 kDa	New England Biolabs, Ipswich, USA

Tabelle 5. Enzyme.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Phusion HF DNA-Polymerase (2 U/μL) mit 5x Puffer	New England Biolabs, Ipswich, USA
Restriktionsenzyme BamHI/PstI (HF, 20 U/μL) mit 10x CutSmart-Puffer	New England Biolabs, Ipswich, USA
T4-DNA-Ligase (1 U/μL)	Invitrogen, Waltham, USA
Pfu Ultra II Phusion HF-Polymerase mit 10x Puffer	Agilent, St. Clara, USA
Restriktionsenzym DpnI (20 U/μL)	Präparation durch technisches Personal
DNase I	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
SUMO-Protease (Ulp1 aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Präparation durch technisches Personal

Tabelle 6. Vektoren und erzeugte Plasmide.

Bezeichnung	Vektor	Bezugsquelle
pET28b_His ₆ -SUMO_PcIDS1 ^{Kan}	modifizierter pET-28b(+)-Vektor mit N-terminalem His ₆ -SUMO-Tag (Smt3p aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Novagen, Darmstadt, DE
pET28b_His ₆ -SUMO_MstE ^{Kan}	modifizierter pET-28b(+)-Vektor mit N-terminalem His ₆ -SUMO-Tag (Smt3p aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Novagen, Darmstadt, DE

Zur Klonierung, bzw. Expression der Gene wurden verschiedene *E. coli* Stämme genutzt. Die Präparation elektrokompeter Zellproben erfolgte stets durch das technische Personal.

Tabelle 7. *E. coli* Stämme.

Bezeichnung	Genotyp	Bezugsquelle
<i>E. coli</i> XL-10 gold	Tet ^r Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lacI^qZΔM15 Tn10</i> (Tet ^r) Amy Cam ^r]	Agilent, St. Clara, USA
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>dcm ompT hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal λ</i> (DE3)	Agilent, St. Clara, USA

Zur Verbesserung der Ausbeute der rekombinanten Expression, wurde die native DNA-Sequenz der Gene *ids1* und *mste* mithilfe der JCat-Software⁹⁴ auf die Codon-Verteilung von *E. coli* angepasst. Genfragmente und Primer wurden durch Eurofins Genomics (Ebersberg, DE) synthetisiert. Lyophilisierte Gene wurden vor ihrer Verwendung mit ddH₂O auf 30 ng/μL verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 8. Verwendete Genfragmente.

Gen	DNA-Sequenz
<i>ids1</i> GenBank: AGE89831.1	TTCTCTAAAGAAGAATCTCGTGAATTCATGGCTATCTTCCCGGACATCGTTCGTGACCTGA CCGACGCTGGTTCGTACACCCGACATCCCGGAAGTTACCAAACGTTTCGCATAAAGTTCTGCA ATACAACGTTCCGACCCGGTAAAAAACCCTGGTCTGTCTACCGTTATCGCTTACAAAATG CTGGAAAAACCGAAAAACCTGACCCCGAAAAACGTTTCGTCTGGCTGGTATCCTGGGTGGT GCGTTGAACTGCTGCAAGCGTCTCTGCTGATCATGGACGACCTGATGGACCGTTCTGAAAC CCGTCGTGGTCAGCCGTGCTGGTACCGTCAGGAAAACGTTGGTTTCCCTGGCTATCAACGAC TGCTGACGTTGAATCTTCTCTGTACTCTGTTCTGCGTAAATACTTCTCTCACCTGCCGT GCTACGTTCCGATCATCGAACTGTTCACGACGTTAACTTCAAACCAACATGGGTACGTC TCTGGACGCTCTGTGCATGAAAGACGGTCGTCCGATCCTGTCTCAGTTCACCATGAAACGT TACTCTTCTATCGTTAAATACAAAACCTCTTACTACACCTTCCAGCTGCCGGTTTCTCTGG GTATGTACCTGGCTGACATGTACGACCCGGAACAGCACCGTCAGGCTAAAACCATCCTGAT GGAAATCGGTGAATTTCTCCAGATCCAGGACGACTTCCCTGGACGCTTTCGGTGACTCTCAG GTTACCGGTAAAAGTTGGTACCGACATCAAAGAAGGTAAATGCTCTTGGCTGGCTGTTGTTG CTCTGCAACGTTCTAACC CGGCTCAGCGTCAGATCATGGAAGAACACTACGGTCGTCCGGA ACCGGAATCTACCCAGATCATCAAAAACCTGTACATCGAACTGGGTCTGCCGGCTACCTTC GCTGTTTACGAAGAAGAATCTTTCAACATCATCCGTACCCACATCCACCAGATCTCTAAAG GTCTGCCGCACGACCTGTCTTCAAATCATGAAGAAGATCTACAAACGTGACGCTTAA

<i>mste</i>	ACCCTGCAACCGCTGGAAAACTCTACCCGTCAGGAAAACTGCTGTACCCGAAACTGAACC
GenBank:	AGCTGTCTAACTCTATCAACGCTGCTGTTGCTTTCCTGCTGGAAGCTCGTAACCTGGAAGG
ATN39899.1	TTGGTGGCAGGACTTCAACTTCCCGCAGGCTGCTTCTATCGGTGACGAATGGGTTACCGCT TACGTTGGTACCATGCTGGCTACCCTGCCGTACGCTCACGTTACGAAAGCTCTGATGCAGG CTTGGGAACTGCTGAAAAATCCGTGACCACCGTCCGACCGGTGAATGGGGTTACAACTACAT CCTGTGCGGTGACGCTGACACCACCGGTTGGGCTCTGCAACTGGCTGCTGCTGTTGGTGC TCTGACTCTGAACGTGCTCAGCAGGCTCGTGCTGCTCTGGCTACCCACCTGCAACCGAACG GTGGTATCGCTACCTTCGCTGAAGAATCTATCCGTGCTTACATCAAAGTCCGGACCTGGC TAACGTTTCTTTCCAGGGTTGGTGCGGTGCTCACACCTGCGTTTCTGCTGCTGTTGCTGCT CTGCCGGAATTCCGTTCTCGTCTGCACGACTACCTGCGTGTACCCAGACCTCTCAGGGTA ACTGGGAAGGTTACTGGTGGTCTGACCACGAATACACCACCGCTCTGACCGCTGAAGCTCT GGCTGCTGGTGGTCAGGCTGCTGACCAGCCGCTATCGAACAGGCTGTTGCTTGGGGTCTG AAACGTCTGTGCCCGCAGGGTTTTCGTTGCTACCTCTAAACACCCGAACGGTTCTACCTTCG CTACCGCTTGGTGCCTGCGTCTGCTGCTGCTGAACACCGTTGACGCTGAAGTTAAAGCTGC TCGTGCTGCTGCTATCGGTTGGCTGCTGGAACAGCAGCGTCCGAACGGTTCTTGGGTTTCT TCTGCTTACCTGCGTATCCCGTACCCGTTTCGACCGTAACCCGAACCAGTTCCCGCACTGGC GTTACTACGACGAAATCGAAGGTGACAAACGTTTCGAAGGTTCTATCATCTTCGACCACAA CTCTATCTTACCACCGCTACCGTTGTTAACTCTCTGGTTAAAGCTGCTCCGATGCTGTAA

Lyophilisierte Primer wurden vor ihrer Verwendung mit ddH₂O auf 100 pmol/μL verdünnt und bei -20 °C gelagert.

Tabelle 9. Verwendete Primer zur Klonierung.

Bezeichnung	Primersequenz
<i>ids1</i> _vorwärts_BamHI	CCA GGA TCC TTC TCT AAA GAA GAA TCT CGT GAA TTC ATG GC
<i>ids1</i> _rückwärts_PstI	CCA CTG CAG TTA AGC GTC ACG TTT GTA GAT CTT CTT CAT G
<i>mste</i> _vorwärts_BamHI	CCA GGA TCC ACC CTG CAA CCG CTG GAA AAC
<i>mste</i> _rückwärts_PstI	CCA CTG CAG TTA CAG CAT CGG AGC AGC TTT AAC C

Tabelle 10. Primersequenzen für die Mutagenese. Geänderte Codons sind rot hervorgehoben.

Mutante	Vorwärtsprimer (5' → 3')	Rückwärtsprimer (5' → 3')
<i>PcIDS1</i> K133A	TAC AAC GTT CCG ACC GGT GCA AAA ACC CGT GGT CTG TC	GA CAG ACC ACG GGT TTT TGC ACC GGT CGG AAC GTT GTA
<i>PcIDS1</i> K133R	AAC GTT CCG ACC GGT AGA AAA ACC CGT GGT CTG	CAG ACC ACG GGT TTT TCT ACC GGT CGG AAC GTT
<i>PcIDS1</i> Y280F	A TAC AAA ACC TCT TAC TTC ACC TTC CAG CTG CCG G	C CGG CAG CTG GAA GGT GAA GTA AGA GGT TTT GTA T
<i>PcIDS1</i> F315A	G ATG GAA ATC GGT GAA TTC GCC CAG ATC CAG GAC GAC TTC	GAA GTC GTC CTG GAT CTG GGC GAA TTC ACC GAT TTC CAT C
<i>PcIDS1</i> F315D	G ATG GAA ATC GGT GAA TTC GAC CAG ATC CAG GAC GAC TTC	GAA GTC GTC CTG GAT CTG GTC GAA TTC ACC GAT TTC CAT C
<i>PcIDS1</i> D319A	C TTC CAG ATC CAG GCC GAC TTC CTG GAC G	C GTC CAG GAA GTC GGC CTG GAT CTG GAA G

<i>PcIDS1</i> D319N	A TTC TTC CAG ATC CAG AAC GAC TTC CTG GAC GC	GC GTC CAG GAA GTC GTT CTG GAT CTG GAA GAA T
<i>PcIDS1</i> K333A	GT GAC TCT CAG GTT ACC GGT GCA GTT GGT ACC GAC ATC A	T GAT GTC GGT ACC AAC TGC ACC GGT AAC CTG AGA GTC AC
<i>PcIDS1</i> K333R	AC TCT CAG GTT ACC GGT AGA GTT GGT ACC GAC AT	AT GTC GGT ACC AAC TCT ACC GGT AAC CTG AGA GT
<i>PcIDS1</i> I420A	G CCG CAC GAC CTG TTC TTC AAA GCC ATG AAG AAG ATC TAC	GTA GAT CTT CTT CAT GGC TTT GAA GAA CAG GTC GTG CGG C
<i>PcIDS1</i> I420D	G CCG CAC GAC CTG TTC TTC AAA GAC ATG AAG AAG ATC TAC	GTA GAT CTT CTT CAT GTC TTT GAA GAA CAG GTC GTG CGG C
MstE D109A	GC GGT GAC GCT GCC ACC ACC GGT TG	CA ACC GGT GGT GGC AGC GTC ACC GC
MstE D109N	CTG TGC GGT GAC GCT AAC ACC ACC GGT	ACC GGT GGT GTT AGC GTC ACC GCA CAG
MstE Y157A	T GAA GAA TCT ATC CGT GCT GCC ATC AAA GTT CCG GAC CTG	CAG GTC CGG AAC TTT GAT GGC AGC ACG GAT AGA TTC TTC A
MstE Y157F	A GAA TCT ATC CGT GCT TTC ATC AAA GTT CCG GAC C	G GTC CGG AAC TTT GAT GAA AGC ACG GAT AGA TTC T
MstE R337A	C TAC GAC GAA ATC GAA GGT GAC AAA GCT TTC GAA GGT TCT A	T AGA ACC TTC GAA AGC TTT GTC ACC TTC GAT TTC GTC GTA G

Pufferlösungen wurden, falls nicht anders beschrieben, in ddH₂O angesetzt und zur Anwendung auf 1x-Konzentration verdünnt.

Tabelle 11. Puffer zur Gelelektrophorese.

Bezeichnung	Zusammensetzung
10x DNA-Ladepuffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,2 1 mM EDTA 50 % (v/v) Glycerin 0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol
50x TAE-Puffer	2 M Tris/Acetat, pH 8,2 100 mM EDTA
Acrylamid-Lösung (fertig angemischt)	39 % (w/v) Acrylamid 1,2 % (w/v) Bisacrylamid
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8 0,4 % (w/v) SDS

5x SDS-Auftragspuffer	60 mM Tris/HCl, pH 6,8 30 % (v/v) Glycerin 10 % (w/v) Sucrose 5 % (w/v) SDS 3 % (v/v) 2-Mercaptoethanol 0,02 % (w/v) Bromphenolblau
10x Laufpuffer	250 mM Tris 1,92 M Glycin 1,0 % (w/v) SDS
Färbelösung	0,05 % (w/v) Coomassie Brilliant Blau R250 25 % Isopropanol 10 % Essigsäure
Entfärbelösung	10 % Essigsäure

Tabelle 12. Puffer zur Proteinreinigung.

Bezeichnung	Zusammensetzung für <i>PcIDS1</i>	Zusammensetzung für <i>MstE</i>
Puffer A	100 mM Tris/HCl, pH 7,5 500 mM NaCl 10 % (v/v) Glycerin 20 mM Imidazol 10 mM 2-Mercaptoethanol 5 mM MgCl ₂	100 mM Tris/HCl, pH 7,5 500 mM NaCl 20 mM Imidazol 10 mM 2-Mercaptoethanol
Puffer B	Puffer A mit 500 mM Imidazol	Puffer A mit 500 mM Imidazol
Puffer C	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM NaCl 10 % (v/v) Glycerin 1 mM 2-Mercaptoethanol	20 mM Tris/HCl, pH 7,5 100 mM NaCl 1 mM 2-Mercaptoethanol
Puffer D	Puffer C mit 1 mM Tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) statt 2-Mercaptoethanol	Puffer C mit 6 mM Dithiothreitol statt 2-Mercaptoethanol

Tabelle 13. Verwendete Liganden.

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dimethylallylpyrophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Isopentenylpyrophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Geranylpyrophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
3-Bromogeranylpyrophosphat	Dr. Abith Vattekkatte ⁹⁵
Farnesylpyrophosphat	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Zoledronsäure (mit NaOH auf pH 7 titriert)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
3-Farnesyl-4,5-dihydroxybenzoesäure	Stefan Leopold-Messer ⁸²
3-Geranylgeranyl-4,5-dihydroxybenzoesäure	Stefan Leopold-Messer ⁸²

Tabelle 14. Software und Webtools.

Bezeichnung	Art/Bezugsquelle
ApE Plasmid Editor v. 2.0.51	Internetwebseite ⁹⁶
ProtParam Webtool	Online-Server ⁹⁷
CFX Maestro 1.1 v. 4.1	BioRad, Hercules, USA
OriginPro 2020 v. 9.7.0.185	OriginLab, Northampton, USA
Microsoft Office 365	Microsoft, Redmond, USA
XDS Programmpaket	Software ⁹⁸
CCP4i Programmpaket	Software ⁹⁹
RCSB PDB	Datenbank ¹⁰⁰
Phaser	Software ¹⁰¹
Refmac5	Software ¹⁰²
Coot v. 0.8.6	Software ¹⁰³
ARP/wARP Solvent	Software ¹⁰⁴
Procheck	Software ¹⁰⁵
FFT	Software ¹⁰⁶
Molscript/Bobscript	Software ¹⁰⁷
PyMol v. 2.5.2	Schrödinger, New York, USA ¹⁰⁸
CorelDraw 2019 v. 21.3	Corel, Ottawa, CA
T-Coffee Sequence Alignment	Online-Server ¹⁰⁹
PDBePISA	Online-Server ¹¹⁰
DALI	Online-Server ¹¹¹
ColabFold	Online-Server ²³

3.2. Methoden

3.2.1. Klonierung der Expressionsplasmide

Synthetisierte Genfragmente wurden mithilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Mullis et al. vervielfältigt.¹¹² Durch geeignete Primer konnten die gewünschten Restriktionsschnittstellen eingefügt werden. Die Reaktionslösung wurde folgendermaßen angesetzt:

20 µL	Phusion HF Puffer (5x)
2 µL	dNTP-Mix (10 mM)
5 µL	Primer (10 pmol/µL, vorwärts)
5 µL	Primer (10 pmol/µL, rückwärts)
1 µL	DNA-Fragment
1 µL	Phusion HF Polymerase
66 µL	ddH ₂ O

Die Reaktion im PCR-Cycler verlief nach folgenden Programmen:

ids1: 30 s bei 98 °C, 10 s bei 98 °C gefolgt von 60 s bei 72 °C (35-mal wiederholt), 10 min bei 72 °C, konstant 4 °C

mste: 30 s bei 98 °C, 10 s bei 98 °C gefolgt von 30 s bei 65 °C und 30 s bei 72 °C (35-mal wiederholt), 10 min bei 72 °C, konstant 4 °C

5 µL des PCR-Produkts wurden mit 5 µL ddH₂O und 1 µL DNA-Ladepuffer vermischt und zusammen mit 5 µL DNA-Leitermix auf ein analytisches 1 % Agarosegel aufgetragen. Dieses wurde durch Aufkochen und anschließendes Abkühlen in der Gießkammer von 50 mL 1x TAE-Puffer mit 0,5 g Agarose hergestellt. Die Elektrophorese lief 30 min in 1x TAE-Puffer bei 120 V. Die Gele wurden durch ein 15-minütiges Bad in Ethidiumbromidlösung (1 mg/L) gefärbt und in einer G:Box unter UV-Licht (365 nm) ausgewertet.

PCR-Proben der richtigen kB-Zahl und hoher Reinheit wurden durch ein Cycle-Pure Kit nach Herstellervorgaben aufgereinigt und mit 50 µL ddH₂O eluiert. Die amplifizierten DNA-Fragmente wurden nach unten stehendem Pipettierschema für einen Restriktionsverdau angesetzt. Der modifizierte Vektor wurde vom technischen Personal bereitgestellt. 50 µL der Vektorprobe (~5 µg) wurden analog verdaut:

50 µL	Eluat
7 µL	CutSmart-Puffer (10x)
2 µL	BamHI-HF (20 U/µL)
2 µL	PstI-HF (20 U/µL)
9 µL	ddH ₂ O

Alle Ansätze wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, und anschließend zusammen mit 10 µL DNA-Ladepuffer auf ein präparatives Agarosegel mit größeren Taschen aufgetragen. Die sonstige Prozedur verlief analog zum analytischen Gel. DNA-Banden der gewünschten kB-Größe wurden ausgeschnitten, mit einem Gel Extraction Kit nach Herstellervorgaben aufgereinigt und mit 30 µL ddH₂O eluiert.

Zur Ligation von Insert und Vektor über die generierten einzelsträngigen DNA-Überhänge, wurden Ansätze nach folgendem Schema pipettiert:

x μ L	Vektor (50 ng)
y μ L	Gen-Insert (5:1 M/M)
7,5-x-y μ L	ddH ₂ O

10 min Inkubation bei 55 °C gefolgt von 5 min auf Eis und Zugabe von:

2 μ L	Ligasepuffer (5x)
0,5 μ L	T4-Ligase

Die Ansätze wurden bei 4 °C über Nacht inkubiert und anschließend in *E. coli* XL-10 gold transformiert. Hierzu wurden 40 μ L einer elektrokompenten Zellsuspension auf Eis aufgetaut, mit 1 μ L der Ligationsprobe vermischt und in eine Küvette überführt. Die Transformation wurde durch einen Puls von mindestens 5 ms bei 2500 V im Elektroporator ausgelöst.¹¹³ Die Zelllösung wurde unmittelbar mit 1 mL SOC-Medium verdünnt und für 1 h bei 37 °C und 700 rpm inkubiert. 100 μ L der Suspension wurden direkt auf einer LB-Agarplatte mit 50 mg/L Kanamycin (Kan₅₀) ausgestrichen. Die übrige Lösung wurde pelletiert, in 100 μ L Überstand resuspendiert und auf einer zweiten Platte ausgestrichen. Alle Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Von den Platten wurden 5-10 Einzelkolonien in je 5 mL LB-Medium (Kan₅₀) in Reagenzglasröhrchen überführt. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 130 rpm wurde die gesamte Probe in einem ERG pelletiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit einem Miniprep Kit nach Angaben des Herstellers. Nach Elution mit 50 μ L ddH₂O wurden alle Proben einem Kontrollrestriktionsverdau nach folgendem Schema unterzogen:

2 μ L	Eluat
1 μ L	CutSmart-Puffer (10x)
0,2 μ L	BamHI-HF (20 U/ μ L)
0,2 μ L	PstI-HF (20 U/ μ L)
6,6 μ L	ddH ₂ O

Nach 1 h bei 37 °C wurden die Proben nach Zugabe von 1 μ L DNA-Ladepuffer durch analytische Agarosegelelektrophorese ausgewertet. Proben bei denen DNA-Banden der erwarteten kB-Zahl zu erkennen waren, wurden zu GATC Biotech (Konstanz, DE) zum Sequenzieren eingeschickt. Die Ergebnisse wurden mit ApE ausgewertet und mit den synthetischen Genfragmenten verglichen. Gereinigte Plasmide der richtigen Sequenz wurden bei -20 °C gelagert.

3.2.2. Einführung von Einzelpunktmutationen

Um die WT-Gene im Expressionsvektor gezielt zu verändern, wurde das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit eingesetzt. Primer wurden nach Vorgaben des Herstellers erstellt (Tab. 10). Die PCR-Ansätze erfolgten nach einheitlichem Schema:

5 μ L	Pfu Ultra II Puffer 10x
1 μ L	dNTP-Mix (10 mM)
125 ng	Primer (10 pmol/ μ L, vorwärts)
125 ng	Primer (10 pmol/ μ L, rückwärts)
1 μ L	WT-Plasmid (20 ng/ μ L)
1 μ L	Pfu Ultra II Phusion Polymerase
auf 50 μ L	ddH ₂ O

Die Reaktion im PCR-Cycler verlief nach folgendem Programm:

5 min bei 95 °C, 30 s bei 95 °C gefolgt von 60 s bei 55 °C und 12 min bei 68 °C (20-mal wiederholt), konstant 4 °C

Durch Zugabe von 2 µL DpnI und Inkubation für 6 h bei 37 °C wurde sichergestellt, dass die methylierte Templat-DNA vollständig abgebaut wurde. Anschließend wurden 3 µL jeder PCR-Probe in *E. coli* XL-10 gold transformiert. Die anschließende Selektion auf positive Klone erfolgte wie beschrieben durch Miniprep, Kontrollverdau und Sequenzierung.

3.2.3. Rekombinante Expression

Zur Expression der Zielproteine wurden die erstellten Plasmide in *E. coli* BL21 (DE3) transformiert. Anschließend wurde eine Einzelkolonie in 5 mL LB-Medium (Kan₅₀) überführt und über Nacht bei 37 °C und 130 rpm inkubiert. Nach 3-minütiger Zentrifugation bei 5.000 g wurde das Zellpellet in 1 mL LB-Medium mit 30 % (v/v) Glycerin resuspendiert und in flüssigem Stickstoff gelagert. Mit einer Pipettenspitze der gefrorenen Suspension wurden Vorkulturen mit 50 mL LB-Medium (Kan₅₀) angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 130 rpm inkubiert.

In 5-Liter-Flasken wurden 2 L LB-Medium (Kan₅₀) mit 40 mL der Vorkultur inokuliert und bei 37 °C und 130 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 inkubiert. Nach Abkühlung für 30 min bei 4 °C wurde die Expression durch Zugabe von 1 mM (Endkonzentration) Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid gestartet und über Nacht bei 20 °C und 130 rpm fortgeführt. Nach der Ernte durch Zentrifugation (30 min, 8.500 g, 20 °C) wurden die Zellpellets mit 0,9 % (w/v) NaCl resuspendiert, erneut abzentrifugiert (10 min, 5.500 g, 4 °C) und bei -20 °C gelagert.

3.2.4. Proteinreinigung

Zellpellets von 10 g wurden in 50 mL Puffer A suspendiert, mit 1 mg DNase I, sowie 5 mg Pefabloc (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) versetzt und durch Beschallung aufgeschlossen (4 min, 80 % Amplitude, 1 s an/aus). Nach Zentrifugation (30 min, 40.000 g, 4°C) wurde der Überstand mit einer Flussrate von 5 mL/min auf eine mit Ni²⁺-Ionen beladene und mit Puffer A äquilibrierte 5-mL-HisTrap-Säule mit einem ÄKTA Prime-System aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit 95 % Puffer A und 5 % Puffer B gewaschen, bis das Absorptionssignal (280 nm) auf eine Grundlinie unter 50 mAU (relative Einheit) zurückkehrte. Das Zielprotein wurde durch einen linearen Gradienten (5-100 % Puffer B) innerhalb von 50 ml Gesamtvolumen 5-mL-Fractionen eluiert.

Um zu bestimmen, welche Fraktionen dabei eine ausreichend hohe Konzentration und Reinheit des Zielproteins aufwiesen, wurde die SDS-PAGE angewandt.¹¹⁴ Hierzu wurden Gele nach folgender Rezeptur erstellt:

Tabelle 15. 12 %ige SDS-Gele.

Substanz	Trenngel (12 %)	Sammelgel (4 %)
Acrylamid-Lösung	6 mL	1 mL
Trenngelpuffer	5 mL	-
Sammelgelpuffer	-	5 mL
ddH ₂ O	9 mL	4 mL
Ammoniumpersulfat (10 % (v/v))	200 µL	200 µL
Tetramethylethyldiamin (1 % (v/v))	20 µL	10 µL

10 µL jeder Peakfraktion wurden mit 2 µL SDS-Auftragspuffer versetzt und 5 min auf 95 °C erhitzt um vollständige Proteindenaturierung zu gewährleisten. Das Gel wurde in der vollständig mit Laufpuffer gefüllten Kammer mit den Proben sowie einem Längenstandard beladen und bei 35 mA laufen gelassen, bis die blau gefärbte Lauffront aus dem Boden austrat. Die Gele wurden 30 min in Färbelösung geschwenkt, mit Wasser gewaschen und mit 10 % Essigsäure entfärbt. Die Dokumentation erfolgte im G:Box-System.

Die Fraktionen, die eine ausreichende Konzentration an Zielprotein enthielten, wurden vereinigt, mit 0,5 mg SUMO-Protease versetzt und über Nacht bei 4 °C gegen 5 L Puffer C dialysiert. Die HisTrap-Affinitätschromatographie wurde wiederholt und der Durchfluss mit Amicon Ultra Zentrifugalfiltern (30 kDa MWCO für *PcIDS1* und 10 kDa MWCO für *MstE*) auf 2 mL konzentriert. Durch Zentrifugation (20.000 g, 4°C, 10 min) wurden eventuelle Proteinaggregate entfernt. Zur Größenausschlusschromatographie wurde eine HiLoad Superdex 200 16/60 Säule in Puffer D bei einer Flussrate von 1,5 mL/min äquilibriert. Der Überstand des Proteinkonzentrats wurde injiziert, aufgetrennt und in 2 mL Fraktionen eluiert. Hochreine Peakfraktionen wurden durch SDS-PAGE ermittelt, gepoolt und auf mindestens 40 mg/mL konzentriert. Die Proteinkonzentration wurde im NanoDrop-Photometer bei 280 nm mithilfe des Extinktionskoeffizienten und Molekulargewichts (ermittelt mit ProtParam) gemessen. Die Proteinlösung wurde entweder sofort verwendet oder in dünnwandigen PCR-Gefäßen in 50 µL Aliquots in flüssigem Stockstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

3.2.5. Thermal Shift Assay

Um geeignete Liganden und Pufferbedingungen für die Kristallisation von *PcIDS1*-Komplexstrukturen zu ermitteln, wurde ein Thermal Shift Assay durchgeführt. Hierbei macht man sich zunutze, dass die kontinuierliche Entfaltung eines Proteins unter thermischem Stress stark von den Parametern der Umgebung (pH-Wert, Ionenkonzentration), sowie der Bindung von Liganden und Cofaktoren abhängt. Die Denaturierung wird dabei durch die Interaktion eines Farbstoffs mit den zunehmend exponierten, hydrophoben Bereichen des Proteins photometrisch nachgewiesen.

Hierzu wurde jede Position einer transparenten 96-Well-PCR-Platte mit 17 µL Analysepuffer vorbereitet (Endkonzentrationen: 100 mM MES pH 7,0, 100 mM NaCl, 10 % (v/v) Glycerin, 5 mM MgCl₂, 2,5 mM TCEP), jeweils hälftig mit, sowie ohne Zugabe von 1 mM MnCl₂. 1 µL der Liganden (gelöst in ddH₂O) wurden hinzugefügt, um Endkonzentrationen von 25, bzw. 200 µM zu erreichen. In Kombination mit Zoledronsäure (ZOL) wurden stets 100 µM Isopentenyl- (IPP), bzw. Geranylpyrophosphat (GPP) zugegeben. Mit dem Phoenix-Nano-

Dispenser-System wurden je 1 μL einer 0,25 mg/mL Proteinlösung (6,25 μM Endkonzentration), sowie einer 1:40-Verdünnung (ddH₂O) von Sypro Orange Stain (Merck, Darmstadt, DE) appliziert. Die Platten wurden versiegelt, durch vorsichtiges Vortexen durchmischt und anschließend zentrifugiert (5 min, 1.000 g, 4°C), um Luftblasen zu entfernen. Die Probenplatte wurde in einem RT-PCR-System 5 min auf 4 °C äquilibriert, bevor die Temperatur in 10-Sekunden-Intervallen um 0,5 °C bis auf 95 °C angehoben und das Fluoreszenzsignal aufgezeichnet wurde. Die Schmelztemperaturen konnten aus den Wendepunkten der Fluoreszenzkurve mithilfe von CFX Maestro ermittelt und die Ergebnisse der Triplikatmessung mit OriginPro analysiert werden. Zur Berechnung der Temperaturverschiebung wurde der Mittelwert (MW) der Referenzmessung ohne Ligandenzugabe vom jeweiligen MW des Messwerts abgezogen.

Die Mittelwerte und die Standardfehler des Mittelwerts (SEM) wurden mithilfe von Excel aus der Microsoft-Office-Suite bestimmt. Für die Fehlerberechnung wurde folgende Formel angewendet und mit der Ableseungenauigkeit von 0,5 °C ergänzt:

$$\text{SEM} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^3 ((\text{MW Probe} - \text{Messwert Probe } i)^2 + (\text{MW Referenz} - \text{Messwert Referenz } i)^2)}{6}} + 0,5$$

Wurde die relative Änderung der Temperaturverschiebung im Vergleich zum WT-Enzym betrachtet, ergab sich der Fehler wie folgt:

$$\text{SEM} = \sqrt{\left(\frac{\text{SEM}}{\text{MW Probe} - \text{MW Referenz}}\right)^2 + \left(\frac{\text{SEM WT}}{\text{MW Probe WT} - \text{MW Referenz WT}}\right)^2} * \frac{\text{W Probe} - \text{MW Referenz}}{\text{W Probe WT} - \text{MW Referenz WT}}$$

3.2.6. Proteinkristallisation

Zur Anzucht von Proteinkristallen wurden die gereinigten Proteine mit Puffer D auf eine Endkonzentration von 20 mg/mL (*PcIDS1*), bzw. 15 mg/mL (*MstE*) gebracht. Für die Co-Kristallisation wurden wahlweise zugegeben: 1 mM MnCl₂, 1 mM ZOL, bzw. 2 mM der anderen Substrate. Die Ansätze wurden nach der Sitting-Drop-Dampfdiffusions-Methode mit NeXtal-Initialscreens durchgeführt. Hierzu wurden die 96 Reservoirs einer Intelli-Platte mit dem Phoenix-Roboter befüllt und anschließend entweder mit dessen NanoDispenser oder einem Oryx4-System mit der Proteinlösung zur Kristallisation vermischt (Verhältnisse Protein zu Reservoir: 0,2 μL + 0,2 μL , 0,2 μL + 0,1 μL , 0,3 μL + 0,1 μL). Die Platten wurden bei 20 °C im Temperierschrank gelagert und am nächsten Tag erstmalig mikroskopisch ausgewertet. Kristalle von zufriedenstellender Größe und Morphologie wurden auf Polarisation und Fluoreszenzemission (UVEX, 280 nm) untersucht. Um die Kristallqualität zu optimieren, wurden auf Basis dieser Erkenntnisse eigene Feinscreens mithilfe eines Microlab-Pipettierroboters entworfen. Zur Cryo-Protektion wurde 1 μL der jeweiligen Reservoirlösung mit 1 μL 60 % (v/v) Glycerin vermischt und davon 1 μL auf den Kristalltropfen gegeben. Nach etwa 30 s wurde der Kristall mithilfe eines CryoLoops entnommen und in flüssigem Stickstoff vitrifiziert.

3.2.7. Röntgenstrukturbestimmung

Die Beugungsdatensätze wurden an der Beamline X06SA der Swiss Light Source (Villigen, CH) gemessen. Native Datensätze wurden mit Synchrotronstrahlung von 1,0 Å Wellenlänge

aufgenommen. Für *PcIDS1*-Kristalle, die in Gegenwart von MnCl_2 oder 3-Br-GPP entstanden, wurde das Auftreten anomaler Streuung mittels eines Fluoreszenzscans verifiziert. Anomale Datensätze wurden im Anschluss bei 1,89 Å (Mn) bzw. 0,92 Å (Br) aufgezeichnet.

Die Intensitäten der Röntgenbeugungsdaten wurden mit XDS ausgewertet und mit XSCALE verarbeitet. Die Auflösungsgrenzen wurden dabei so gewählt, dass sie die folgenden Kriterien erfüllten: $I/\sigma(I) > 2,0$; $R_{\text{merge}} < 70\%$ und Redundanz $> 3,0$. Für anomale Datensätze wurden die Friedel-Paare dabei als individuelle Reflexe angesehen. Zur weiteren Datenanalyse und Strukturverfeinerung wurden, sofern nicht anderweitig angegeben, Programme aus dem CCP4i-Softwarepaket verwendet. Durch Bestimmung des Matthews-Koeffizienten konnte die Anzahl der Proteinmoleküle in der asymmetrischen Untereinheit abgeschätzt und die Phasierung erleichtert werden.

Nach Identifizierung eines geeigneten Strukturmodells durch Sequenzsuche in der PDB, wurden Patterson-Suchen mithilfe von Phaser durchgeführt. Hierzu wurde eine einzelne Proteinkette des jeweiligen Suchmodell ohne Liganden, Ionen und Wassermoleküle eingesetzt. Falls erforderlich, wurden Regionen mit niedriger Sequenzidentität durch Alaninreste ersetzt oder teilweise entfernt. Nach einer potenziell erfolgreichen Phasierung ($R_{\text{free}} < 45\%$) wurde das Modell mit Refmac5 gegen die experimentellen Daten verfeinert. Anschließend konnte das Strukturmodell durch Coot im Wechsel mit iterativen, geometrisch eingeschränkten Verfeinerungszyklen mit Refmac5 an die Primärsequenz angepasst, ergänzt und händisch verbessert werden. Alle Datensätze wiesen eine ausreichend hohe Auflösung auf, um Wassermoleküle mit ARP/wARP automatisiert zu platzieren. In den nachfolgenden Schritten wurde das Modell um Liganden und Ionen ergänzt und durch TLS (Translation/Libration/Screw)-, sowie eingeschränkte Verfeinerungen finalisiert. Hierbei wurden optimale R_{work} - und R_{free} -Werte ($< 20\%$, $\Delta < 4\%$), sowie möglichst niedrige RMSD-Parameter für Bindungslängen und -winkel (validiert durch Procheck) angestrebt. Die abgeschlossenen Strukturdatensätze wurden in der RCSB-PDB hinterlegt (Tab. 18 und 19) und als Phasierungsmodell für alle weitere Komplex-/Mutantenstrukturen verwendet. Zur Identifikation der Mn- und Br-Atompositionen in den Komplexstrukturen wurden anomale Differenz-Patterson-Karten mit FFT berechnet.

3.2.8. Datenauswertung und -aufbereitung

Alle Ausschnitte der Proteinstrukturen wurden mit Molscript/Bobscript oder PyMol angefertigt. Die Abbildungen wurden mit CorelDraw, OriginPro und PowerPoint (Microsoft Office) erstellt; Sequenzalignments wurden mit T-Coffee durchgeführt. Aminosäurereste wurden mit dem Ein-Buchstabencode beschriftet. Falls nicht anderweitig beschrieben, wurden Liganden und Seitenketten als Stab-, Ionen als Kugel-, und Proteinregionen als Cartoonmodell dargestellt. Für *PcIDS1* wurden Liganden an den allylischen (Al) cyan, den homoallylischen (HA1) lila und den allosterischen Stellen (Allo) türkis eingefärbt. Mg^{2+} -Ionen sind schwarz, Mn^{2+} -Ionen pink und Wassermoleküle rot gefärbt, wobei schwarze Striche polare Wechselwirkungen andeuten. Wenn nicht anders angegeben, sind für *PcIDS1* F_0 - F_C -Elektronendichtekarten (grünes oder blaues Netz, auf $3,0\sigma$ konturiert) oder Differenzdichten des anomalen Signals (rosa für Mn und blaues Netz für Br, $10,0\sigma$) gezeigt. Die Liganden wurden hierfür von der Phasierung ausgeschlossen. Die $2F_0$ - F_C -Elektronendichtekarten um Mg^{2+} -Ionen in *PcIDS1* und Liganden in MstE sind auf $1,0\sigma$ konturiert und grau gefärbt.

4. Ergebnisse

4.1. *PcIDS1* aus *Phaedon cochleariae*

4.1.1. Klonierung, Expression und Reinigung

Das Gen von *PcIDS1* wurde entsprechend den Angaben in *Material und Methoden* in einen pET28b-His₆-SUMO-Vektor über die Restriktionsschnittstellen BamHI und PstI einkloniert. Zur Optimierung der Löslichkeit und Kristallisationstendenz wurde dabei auf das postulierte, N-terminale Signalpeptid (Position 1-85) verzichtet.¹¹⁵ Da der C-Terminus in IDS eine katalytische Funktion aufweist, wurde der trunke N-Terminus mit einem SUMO-Tag versehen, um so optimalen Ertrag bei minimaler Aggregation durch heterologe Expression des tierischen Proteins in *E. coli* zu gewährleisten.¹¹⁶ Die Wichtigkeit des SUMO-Tags zeigte sich bereits bei ersten Reinigungsversuchen, als während des proteolytischen Verdaus des SUMO-*PcIDS1*-Konstrukts starke Aggregation auftrat. Dieser konnte größtenteils mit dem Zusatz von 10 % Glycerin und 5 mM MgCl₂ in allen Puffern beigegeben werden. Während die Zugabe selbst niedriger Konzentrationen von CoCl₂ die Präzipitation förderte, zeigten sich keine negativen Auswirkungen durch 1 mM MnCl₂, welches somit für alle weiteren Schritte verwendet wurde. Sichtbare Eintrübungen der Proteinlösungen konnten stets durch Zentrifugation abgetrennt werden und hatten keinen Einfluss auf Folgeexperimente.

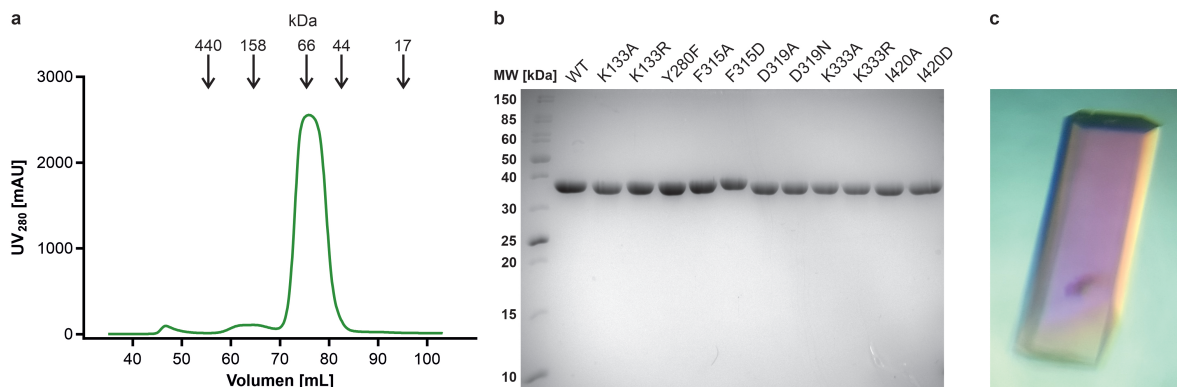


Abbildung 10. Reinigung und Kristallisation von *PcIDS1*. a, Größenausschlusschromatographie von *PcIDS1* Wildtyp unter Verwendung einer Superdex 200 16/60 Säule. Die entsprechenden Retentionsvolumina verschiedener Standardproteine sind gemäß der Herstellerangaben aufgetragen. *PcIDS1* bildet ein Homodimer, das bei 76 mL eluiert. b, Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigt, dass alle gereinigten Proteinvarianten der erwarteten Größe von 40 kDa entsprechen. Auf jede Spur wurden 5 µg Protein aufgetragen. Geringe Abweichungen sind auf Unregelmäßigkeiten bei der Gelpolymerisation zurückzuführen. c, Ein typischer *PcIDS1*-Kristall von 200 x 50 µm Größe, betrachtet unter einem Lichtmikroskop mit Polarisationsfilter. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

Die Peaks der SEC-Läufe von *PcIDS1* Wildtyp (WT), sowie aller im Laufe der Arbeit generierten Mutanten, zeigten einen scharfen, einzelnen Peak bei 76 mL, was dem hydrodynamischen Volumen eines Homodimers entspricht. Die Abwesenheit eines Mono-, bzw. Oligomerpeaks unterstreicht die Stabilität und Dominanz der Dimerespezies (Abb. 10a). Nach Vereinigung und Konzentration der Peakfraktionen weist die durchgeführte SDS-PAGE für keines der verwendeten Proteine signifikante Verunreinigungen auf (Abb. 10b). Das

Einfrieren mit flüssigem Stickstoff zeigte keinen negativen Effekt auf die Kristallisationstendenz nach Lagerung und Auftauen (Abb. 10c).

4.1.2. Thermal Shift Assay

Um die Proteinstabilität und somit die Interaktionstendenz zwischen *PcIDS1* und verschiedenen Metallionen und Liganden zu charakterisieren, wurde ein Thermal Shift Assay (TSA) durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass sich das Protein in einem Puffer mit 5 mM $MgCl_2$ bereits bei 40,5 °C zu entfalten beginnt. Die Zugabe von 1 mM $MnCl_2$ hat darauf nur begrenzten Einfluss, der sich nicht auf die Art des Metalls zurückführen, aber mit der höheren Ionenkonzentration erklären lässt (Abb. 11). Ist das allylische Substrat DMAPP vorhanden, verschiebt sich die Denaturierungstemperatur für Mg^{2+} um 3 °C, aber um fast 10 °C in Gegenwart von Mn^{2+} . Erstaunlich ist, dass diese Differenz auch mit IPP erhalten bleibt, welches den Proteinkomplex insgesamt sogar stärker stabilisiert ($\Delta 14$ °C für Mn^{2+} , $\Delta 7$ °C für Mg^{2+}). Eigentlich sollte sich in dieser Enzymklasse die HAI-Stelle zur IPP-Bindung erst nach Aufnahme eines allylischen Substrats bilden und metallunabhängig sein. Somit ist davon auszugehen, dass IPP mit beiden Metallen allosterisch in die AI-Stelle binden kann, während mit Mn^{2+} und C_5 -Substraten die Proteinstabilität gleichermaßen signifikant zunimmt. Mn^{2+} hat hingegen keinen Einfluss auf den drastischen Effekt ($\Delta 28$ °C) des AI-spezifischen Liganden Zoledronsäure (ZOL). Allerdings stieg für beide Metalle die Denaturierungstemperatur durch Zugabe von IPP weiter an ($\Delta 37$ °C), was vermuten lässt, dass Inhibitor und Substrat sowohl mit der AI- als auch mit der HAI-Bindestelle interagieren. Bei GPP, dem Produkt der ersten Elongation, war die thermische Verschiebung deutlich ($\Delta 17$ °C), aber unabhängig von der Metallspezies. Das Endprodukt FPP zeigte nur mäßigen Einfluss auf die Komplexbildung ($\Delta 5$ °C für Mn^{2+} , $\Delta 7$ °C für Mg^{2+}), da es nicht weiter umgesetzt wird und somit vermutlich nicht an die AI-Stelle binden kann. Insgesamt korrelieren die Ergebnisse des TSA mit der postulierten Substratpräferenz von Mn^{2+} für DMAPP, sowie Mg^{2+} für GPP.

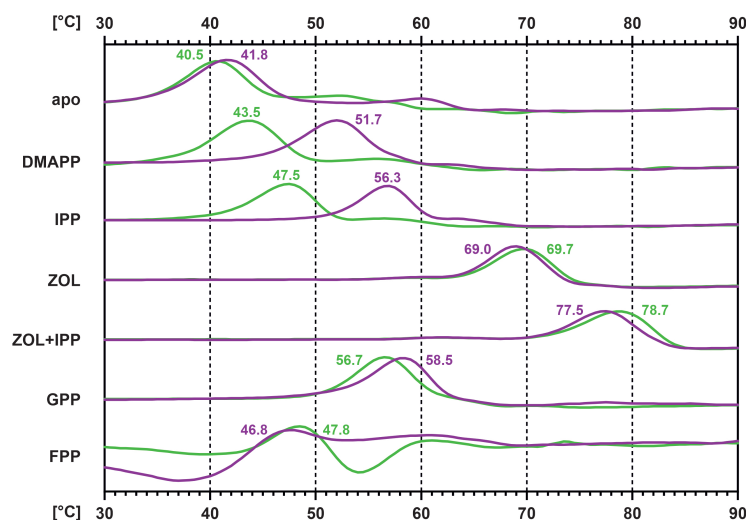


Abbildung 11. Thermische Stabilität von *PcIDS1* in Komplex mit verschiedenen Metallionen und Liganden. Das Fluoreszenzsignal von rekombinantem *PcIDS1* (6,25 μ M) wurde zwischen 30 und 90 °C in Abwesenheit (apo), bzw. mit 200 μ M der jeweiligen Liganden (100 μ M IPP in Kombination mit ZOL) aufgezeichnet. Gezeigt ist die zeitliche Ableitung in relativen Einheiten. Die mittlere Schmelztemperatur für reinen $MgCl_2$ -Puffer (5 mM, grün) und in Kombination mit $MnCl_2$ (1 mM, lila) ist in °C angegeben. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

Das TSA wurde sowohl für *PcIDS1* WT als auch für alle Proteinmutanten durchgeführt (Abb. 12). Zusätzlich zu Abb. 11 sind alle Messdaten für den Inhibitor 3-Br-GPP, sowie ZOL in Kombination mit GPP aufgeführt. Um den Effekt der jeweiligen Substrate, Inhibitoren und Liganden hervorzuheben, ist lediglich die Änderung der Schmelztemperatur angegeben. Die thermische Stabilität des jeweiligen Enzyms ohne Liganden liegt dabei in allen Fällen auf dem Niveau von *PcIDS1*_WT ± 2 °C.



Abbildung 12. Verschiebung der thermischen Stabilität durch Liganden von *PcIDS1*. Die Balken geben die Zunahme der mittleren Schmelztemperatur in °C verglichen mit dem jeweiligen apo-Enzym an. Die Liganden

wurden zusammen mit 5 mM MgCl₂ (grün), bzw. zusätzlich 1 mM MnCl₂ (violett) in einer Konzentration von 25 µM (dunkel) oder 200 µM (hell) eingesetzt. Fehlerbalken entsprechen dem Standardfehler des Mittelwerts einer Triplikatmessung. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

4.1.3. Kristallisation und Strukturbestimmung

Kristallisationsansätze wurden analog der in *Material und Methoden* beschriebenen Sitting-Drop-Dampfdiffusions-Methode durchgeführt. Nach initialer Kristallisationstendenz in Ansätzen des Phoenix-Roboters, wurden Feinscreens aufgrund der schonenderen Applikation der Proteinlösung im Oryx4-System durchgeführt. Die Kristallisationsdauer erstreckte sich dabei über wenige Tagen bis hin zu einigen Wochen. Trotz zahlreicher Versuche der Ligandierung mit CoCl₂, blieb die Kristallisation selbst bei niedrigen Salzkonzentrationen aus. Hingegen war die Kristallisation mit Mn₂Cl, sowie vieler Substrate, Inhibitoren und Produkte erfolgreich.

Tabelle 16. Bedingungen für die Sitting-Drop-Kristallisation von PcIDS1. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

Ansatz	Konz. [mg/mL]	Protein-Reservoir-Verhältnis [µL/µL]	Zusammensetzung des Reservoirs	Cofaktoren Liganden
PcIDS1 _{apo}	20	0,2 + 0,2	0,1 M Tris, pH 8,5 0,2 M MgCl ₂ 20% PEG 8000	MgCl ₂
PcIDS1 _{Mg} IPP:IPP	20	0,2 + 0,2	0,1 M Bis-Tris, pH 6,5 0,2 M MgCl ₂ 25% PEG 3350	MgCl ₂ IPP
PcIDS1 _{Mn} IPP:IPP	20	0,2+0,1	0,1 M Bis-Tris, pH 6,5 0,2 M MgCl ₂ 26% PEG 3350	MgCl ₂ /MnCl ₂ IPP
PcIDS1 _{Mg} GPP	20	0,3+0,1	0,1 M MES, pH 6,5 0,15 M MgCl ₂ 28% PEG 4000	MgCl ₂ GPP
PcIDS1 _{Mn} GPP:GPP	20	0,2+0,2	0,4 M Kaliumformiat 19% PEG 3350	MgCl ₂ /MnCl ₂ GPP
PcIDS1_F315A _{Mg} 2GPP	20	0,3+0,1	0,1 M MES, pH 6,5 0,2 M MgCl ₂ 25% PEG 4000	MgCl ₂ GPP
PcIDS1_F315A _{Mg/Mn} GPP:PP	20	0,2+0,2	0,1 M MES, pH 6,5 0,6 M NaCl 20% PEG 4000	MgCl ₂ /MnCl ₂ GPP
PcIDS1 _{Mg} 3-Br-GPP	20	0,2+0,2	0,1 M MES, pH 6,5 0,2 M MgCl ₂ 25% PEG 4000	MgCl ₂ 3-Br-GPP
PcIDS1_D319N _{Mg} 3-Br-GPP	20	0,2+0,2	0,1 M MES, pH 6,5 0,2 M MgCl ₂ 25% PEG 4000	MgCl ₂ 3-Br-GPP
PcIDS1 _{Mg} ZOL:IPP	20	0,2 + 0,2	0,1 M Bis-Tris, pH 5,5 0,2 M NaCl 19% PEG 3350	MgCl ₂ ZOL IPP
PcIDS1 _{Mn} ZOL:IPP	20	0,2 + 0,2	0,1 M Bis-Tris, pH 5,5 0,1 M NaCl 23% PEG 3350	MgCl ₂ /MnCl ₂ ZOL IPP
PcIDS1 _{Mg/Mn} ZOL:IPP	20	0,2 + 0,1	0,1 M Bis-Tris, pH 6,5 0,1 M MgCl ₂ 26% PEG 3350	MgCl ₂ >> MnCl ₂ ZOL IPP

<i>PcIDS1</i> _{Mg} ZOL:GPP	20	0,2+0,2	0,1 M Bis-Tris, pH 6,5 45% PEG 400	MgCl ₂ ZOL GPP
<i>PcIDS1</i> _{I420A} _{Mg} GPP:MES	20	0,2+0,1	0,1 M MES, pH 6,5 0,2 M CaCl ₂ 30% PEG 4000	MgCl ₂ /MnCl ₂ GPP

Die Strukturaufklärung des ermittelten apo-Datensatzes gelang durch molekularen Ersatz mit einer FPPS aus *Gallus gallus* (PDB ID: 1UBX²⁵). Auf Grundlage dessen konnten anschließend alle weiteren Strukturen bei Auflösungen von 1,2 bis 2,5 Å bestimmt werden (Tab. 18). Die konservierte IDS-Faltung weist 13 α -Helices (α A bis α J und α 1 bis α 3, Abb. 13a) in jeder der beiden Untereinheiten (SubA und SubB) auf, die gemeinsam ein Homodimer mit einer Kontaktfläche von 2,000 Å² bilden.¹¹⁰ Der beste Treffer einer DALI-Suche nach verwandten Strukturen ist eine FPPS aus *Trypanosoma brucei* (PDB ID: 3EWG¹¹⁷) mit einem Z-Wert von 36,1 bei 30 % Sequenzidentität.¹¹¹

Abbildung 13 zeigt den helikalen Aufbau des Enzyms und veranschaulicht die in dieser Arbeit identifizierten katalytischen und regulatorischen Bindestellen anhand der Kristallstruktur von *PcIDS1* in Gegenwart von IPP.

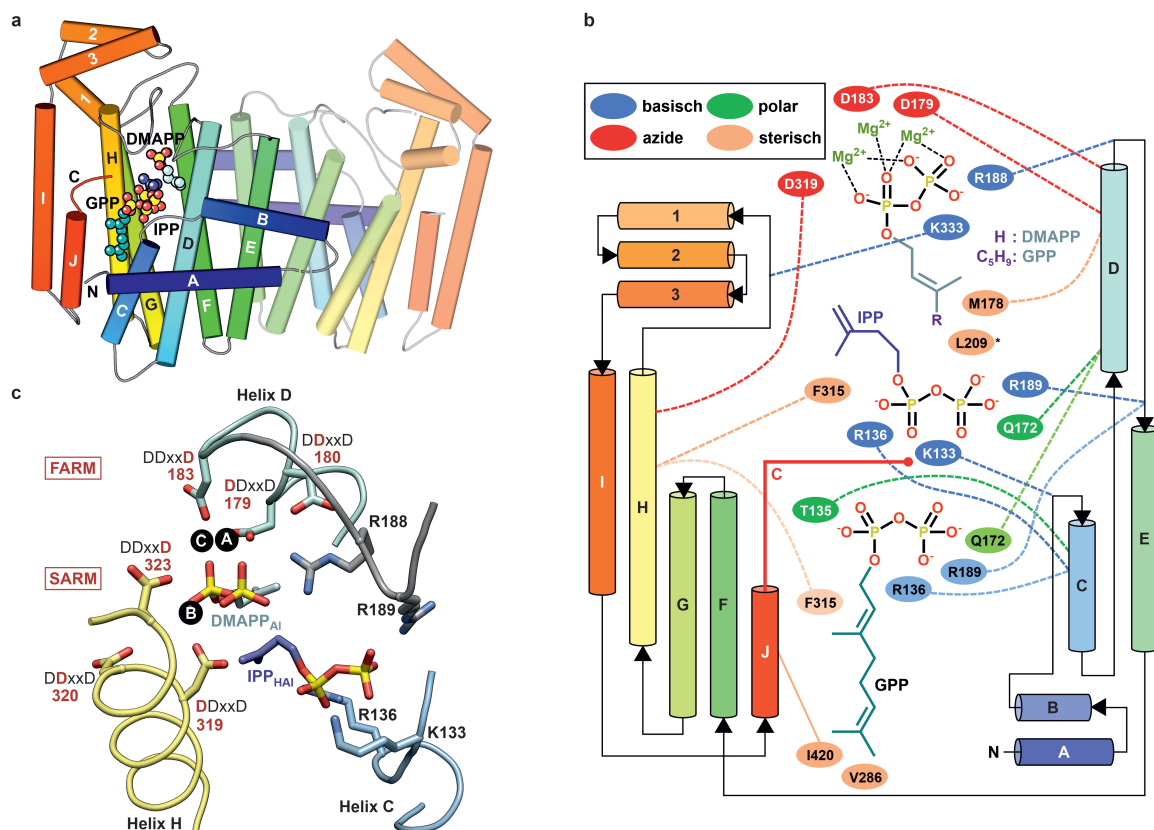


Abbildung 13. Topologie von *PcIDS1*. a, Cartoon-Darstellung mit α -Helices als Zylinder, eingefärbt von blau bis rot (N- bis C-Terminus, zweite Untereinheit transparent). Die Helices sind von A-H, 1-3 und I-J beschriftet. Die AL- und HAL-Bindestellen werden von DMAPP (cyan, stellvertretend für IPP aus der Kristallstruktur), bzw. IPP (lila) eingenommen. Ein GPP-Molekül kann allosterisch (GPP_{Allo}) an das aktive Zentrum binden und konkurriert dabei um Seitenketten der HAL-Stelle. b, Schematische Topologie einer Untereinheit. Der Verlauf des C α -Rückgrats ist durch Pfeile gekennzeichnet. Seitenketten, die Liganden (analog zu a) koordinieren, sind mit ihrer

jeweiligen Position im Enzym verbunden und entsprechend der Art der Interaktion eingefärbt. Ein Asterisk markiert einen Rest des Dimerpartners. Der C-Terminus, der sich erst durch IPP_{HAI}- oder GPP_{Allo}-Bindung ordnet, ist rot hervorgehoben. **c**, Ein Zoom auf das aktive Zentrum zeigt, wie das FARM und SARM den Metallionencluster um DMAPP_{Al} stabilisieren. Gleichzeitig wird IPP_{HAI} durch basische Reste am N-Terminus von Helix C koordiniert. R188 und R189 bilden starke H-Brücken mit PP_{Al}, bzw. PP_{HAI} aus. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

4.1.4. Prinzipien der Katalyse in *PcIDS1*

In *PcIDS1*_{apo} (PDB ID: 8A6U) sind die Aminosäurereste an N- und C-Terminus, sowie in den Loopregionen α D-E (183-201) und α H-1 (329-332) fehlgeordnet. Dies betrifft auch das letzte Aspartat des FARMs, während D319 im SARM beider Untereinheiten jeweils ein fünffach-hydratisiertes Mg²⁺-Ion koordiniert (Mg²⁺_B, Abb. 14a).

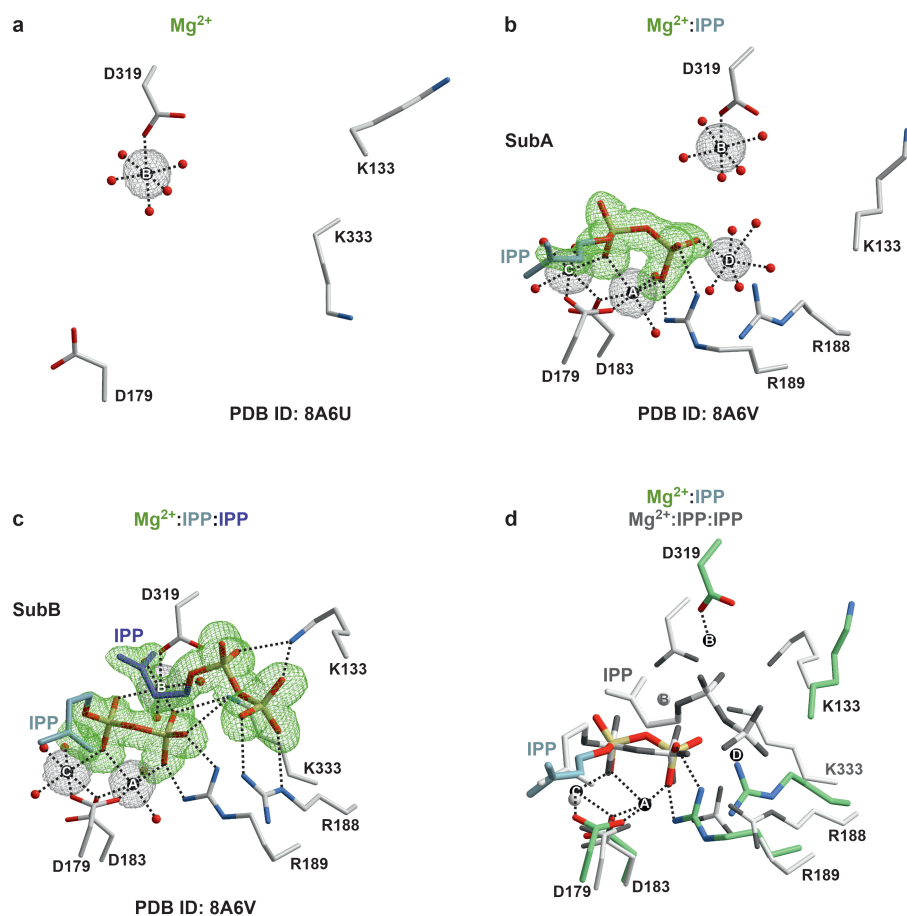


Abbildung 14. Das aktive Zentrum von *PcIDS1* bindet seine Substrate schrittweise. **a**, *PcIDS1*_{apo}: Ein fünffach-hydratisiertes Mg²⁺ an Position B koordiniert an D319. Der Substratloop α D-E ist fehlgeordnet. **b**, *PcIDS1*_{Mg:IPP}: Ein IPP-Molekül ahmt das native Substrat DMAPP_{Al} nach. Vier Mg²⁺-Ionen (A-D) sind um die PP_{Al}-Einheit gruppiert (offener Zustand). Der Substratloop ist geordnet und koordiniert das β -Phosphat (P _{β}) über R189. **c**, *PcIDS1*_{Mg:IPP:IPP}: Das native gebundene IPP_{HAI} wird von K133, R136 und R189 koordiniert und erzwingt die Umordnung des allylischen Liganden in die ekliptische Konformation (geschlossener Zustand). Mg²⁺_B wird durch das SARM zwischen beide Phosphate geschoben und interagiert mit diesen. Mg²⁺_D wird verdrängt und P _{β} koordiniert stattdessen K333. **d**, Überlagerung von *PcIDS1*_{Mg:IPP} und *PcIDS1*_{Mg:IPP:IPP}: Die Bindung von IPP_{HAI} löst eine Kontraktion des aktiven Zentrums aus. Während Mg²⁺_A und Mg²⁺_C an ihren Positionen verbleiben, löst Mg²⁺_B die Interaktion von PP_{Al} mit Mg²⁺_D ab. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

Die anschließend bestimmte Komplexstruktur mit IPP (PDB ID: 8A6V) wies erhebliche Unterschiede zwischen den beiden Untereinheiten (SubA und SubB) auf. SubA zeigt einen offenen Zustand wie in apo und enthält ein einzelnes IPP-Molekül an der Al-Stelle mit 5 Å Abstand zu Mg^{2+}_B , das das native Substrat DMAPP nachahmt (Abb. 14b). D179 und D183 koordinieren PP_{Al} in einer gestaffelten Konformation über Mg^{2+}_A und Mg^{2+}_C . Die Elektronendichtekarte zeigt eine zusätzliche, fünffach-hydratisierte Metallbindestelle (Mg^{2+}_D) am β -Phosphat (P_β) die bislang in der IDS-Enzymklasse nicht beschrieben wurde. Die Bindung von IPP_{Al} ermöglicht eine starke Wasserstoffbrücke zwischen R188 und P_β , worüber die zuvor ungeordnete Region $\alpha D-E$ in einen definierten Substratloop überführt wird. Bemerkenswert ist, dass diese Region symmetrische Kationen- π -Wechselwirkungen (-WW) mit dem Substratloop aus SubB eingeht, was auf eine Kooperativität zwischen den zwei Al-Bindestellen hindeutet (Abb. 15a).

Überraschenderweise sind in SubB zwei IPP-Moleküle gebunden, wodurch diese Untereinheit dem Zustand vor der ersten Kettenverlängerung entspricht, ohne dabei katalytisch aktiv zu sein. Im Vergleich zum offenen Zustand sind umfangreiche Konformationsänderungen zu beobachten (Abb. 14c, Tab. 20). Durch Bindung von IPP_{HAI} ordnet sich der Bereich mit dem SARM um und verschiebt sich zusammen mit $\alpha 3$ und dem N-Terminus von αI in Richtung der Al-Stelle. Die zuvor flexible Region 327-336 bildet dabei eine kurze α -Helix, die die Seitenkette von K333 zwischen PP_{Al} und D319 verankert (Abb. 15b). Dieser Induced Fit verschiebt Mg^{2+}_B um 4 Å, zwischen die beiden Phosphate von IPP_{Al} , löst aber gleichzeitig die Freisetzung von Mg^{2+}_D aus (Abb. 14d). Dies zwingt PP_{Al} in eine ekliptische Konformation, was die Entstehung des Carbokations erleichtert. Indem IPP_{HAI} an die basischen Seitenketten von K133, R136, sowie R189 bindet, wird außerdem der C-Terminus (425-429) rekrutiert. F315 stabilisiert diesen durch Kationen- π -WW und positioniert IPP_{HAI} für den nukleophilen Angriff (Abb. 15c). Die Relevanz dieser Aminosäurepositionen spiegelt sich im TSA in einer signifikant verringerten Komplex-Stabilität mit DMAPP und IPP für Varianten K133R, K133A und F315A wider (Abb. 12).

Vergleicht man den offenen (SubA) mit dem geschlossenen Zustand (SubB), fällt ein weiterer Zusammenhang zwischen der HAI- und Al- Bindestelle ins Auge: IPP_{HAI} interagiert mit Q172 und unterbricht damit dessen H-Brücke zu E169. Die dadurch hervorgerufene Verschiebung von Y280 löst eine 120°-Drehung der allylischen Prenyleinheit aus (Abb. 15d). Ein Modell des nativen Komplexes mit DMAPP (Abb. A1) zeigt, dass diese Reorientierung wesentlich ist, um den optimalen Abstand (3,2 Å) zwischen dem entstehenden Carbokation und der IPP_{HAI} -Doppelbindung zu erreichen.

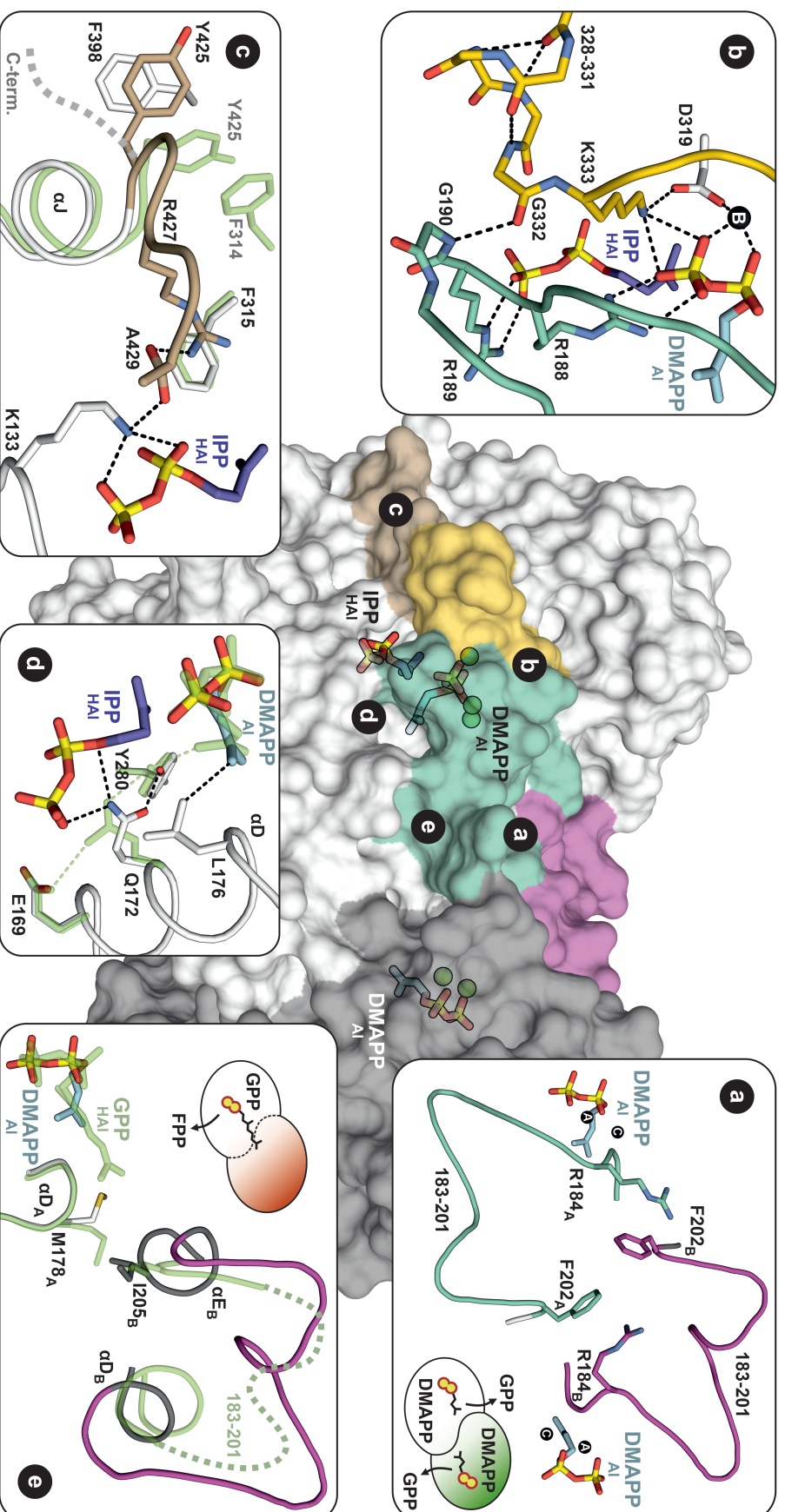


Abbildung 15. Die Regulation von *PcIDS1*. Die Abbildung zeigt eine Oberflächendarstellung von *PcIDS1*_{mg}:IPP:DMAPP (PDB ID: 8A6V). DMAPP_{AI} wurde analog zu Abb. A1 in SubA (grau) und SubB (weiß) modelliert. **a**, DMAPP_{AI}-Bindung ordnet den Substratloop (183-201, cyan) und hat einen kooperativen Effekt auf die benachbarte Untereinheit (Ila) durch Kationen- π -WW zwischen R184 und F202. GPP kann gleichzeitig in beiden aktiven Zentren gebildet werden (Schema). **b**, IPP_{HAI} forciert den geschlossenen Zustand, wobei R188 und R189 (cyan) den beiden PP-Einheiten zugewandt sind. D319 bewegt sich in Richtung DMAPP_{AI} und stabilisiert die eklipische Konformation über Mg²⁺_B und K333 (gold). Die Region 328-331 ordnet sich zu einer Helix und verankert den Substratloop. **c**, Der C-Terminus (braun) ordnet sich aus einem flexiblen Zustand (grün), indem sich Y425 invertiert und eine π - π -WW mit F398 eingeht. F315 bietet eine Kontaktfläche für die Isoprenyleinheit und ermöglicht Kationen- π -WW mit R427. Die terminale Carboxylgruppe von A429 orientiert sich zwischen R427 und K133, wodurch PP_{HAI} stabilisiert wird. **d**, In Gegenwart von IPP_{HAI} löst Q172 die H-Brücke zu E169 (grün) auf und verdrängt Y280, wodurch sich der Prenylrest in der AI-Stelle in Richtung L176 dreht. **e**, Die C₁₀-Prenyleinheit von GPP unterbindet die Ausbildung des Substratloops am Terminus von α E_B in der benachbarten Untereinheit, indem sie M178_A gegen 1205_B drückt. Die Synthese von FPP läuft somit nur in einer einzelnen Domäne gleichzeitig ab (Schema). Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

Zur Charakterisierung der zweiten Substratverlängerung konnte die Komplexstruktur $PcIDS1_{Mg}:GPP$ (PDB ID: 8A70) bestimmt werden. Im Gegensatz zu IPP_{Al} , bindet GPP_{Al} in Gegenwart von Mg^{2+} nur an eine Untereinheit (SubA), während die zweite (SubB) unbesetzt bleibt (Abb. 16a). Der Bindemodus in SubA ist identisch zum offenen Zustand des Enzyms mit IPP_{Al} (Abb. 16b), allerdings schafft sich die distale C_6-C_{10} -Einheit von GPP_{Al} eine geräumigere Bindetasche, indem die Seitenkette von M178 invertiert.

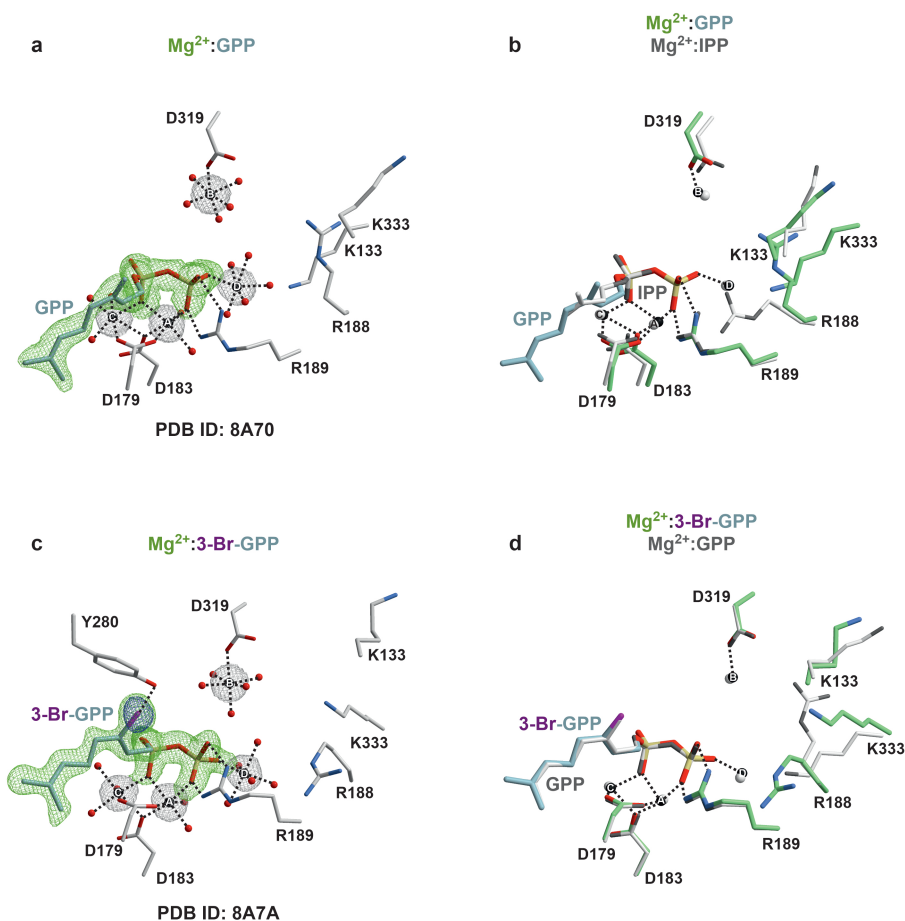


Abbildung 16. $PcIDS1$ im Komplex mit GPP und 3-Br-GPP. **a**, $PcIDS1_{Mg}:GPP$: Analog zum Bindemodus von IPP_{Al} , gruppieren sich vier Mg^{2+} um GPP_{Al} . **b**, Überlagerung von $PcIDS1_{Mg}:GPP$ und $PcIDS1_{Mg}:IPP$: Die grundlegende Architektur der Al-Stelle ist identisch, IPP weist durch die fehlende allylische Doppelbindung höhere Flexibilität auf. **c**, $PcIDS1_{Mg}:3-Br-GPP$: Der Inhibitor 3-Br-GPP bindet an die Al-Stelle und wird von vier Mg^{2+} Ionen umgeben. Die anomale Elektronendichte von Brom ist blau eingefärbt. **d**, Überlagerung von $PcIDS1_{Mg}:3-Br-GPP$ und $PcIDS1_{Mg}:GPP$: Der Bindungsmodus des Inhibitors stimmt mit GPP_{Al} überein. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

Als nächstes wurde unter Einsatz des Inhibitors 3-Br-GPP versucht, eine geschlossene Untereinheit zusammen mit IPP_{HA1} zu erhalten. Dieses halogenierte Surrogat verhindert die Entstehung des Carbokations durch das elektrophile Brom und blockiert somit die Katalyse.⁹⁵ Zwar war eine Co-Kristallisation erfolgreich ($PcIDS1_{Mg}:3-Br-GPP$, PDB ID: 8A7A) und weist einen identischen Bindemodus des Liganden aus (Abb. 16c), aber die $HA1$ -Stelle bleibt unbesetzt. Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, dass das Halogenatom den offenen Zustand durch eine polare Wechselwirkung mit Y280 stabilisiert. Diese verhindert die Reorientierung von GPP_{Al} , die zur Erreichung des aktiven Komplexes notwendig ist (Abb.

A1d). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die GPP- und FPP-Synthese in Gegenwart von Mg^{2+} demselben katalytischen Prozess folgen.

4.1.5. GPP-Bindung bricht die Dimersymmetrie

Die Asymmetrie der $PcIDS1_{Mg}:GPP$ -, sowie 3-Br-GPP-Komplexe lässt sich darauf zurückführen, dass die C_{10} -Prenyleinheit von GPP_{AI} die $M178$ -Seitenkette in SubA ($M178_A$) nicht nur invertiert, sondern auch gegen $I205_B$ in der benachbarten Untereinheit drückt. Durch diese Umlagerungen wird der Substratloop und das gesamte aktive Zentrum in SubB destabilisiert (Abb. 15e). Bei einem Screen verschiedener Proteinmutanten in Gegenwart von GPP, wurde jedoch eine Kristallstruktur von $PcIDS1_F315A$ mit zwei GPP_{AI} -Molekülen identifiziert (PDB ID: 8A74). Während GPP_{AI} dem beschriebenen Bindemodus folgt, ist diese Anordnung nur durch eine geknickte Konformation des Liganden in SubB möglich, der im sterischen Konflikt mit $M178_B$ steht (Abb. 17a). Vermutlich ist diese artifizielle Konfiguration aufgrund des veränderten katalytischen Netzwerks durch Entfernung der Phenylgruppe entstanden (Abb. 17b). Zwar stabilisiert der jeweilige Metallionencluster beide GPP_{AI} -Moleküle, der Substratloop in SubB ist jedoch nur in der FARM-Region definiert und kann kein IPP_{HAI} binden. Somit findet die Bildung von FPP zu jedem Zeitpunkt nur in einem aktiven Zentrum statt, der beeinträchtigte Substratloop behält jedoch eine gewisse Affinität für allylische Liganden weiterhin bei.

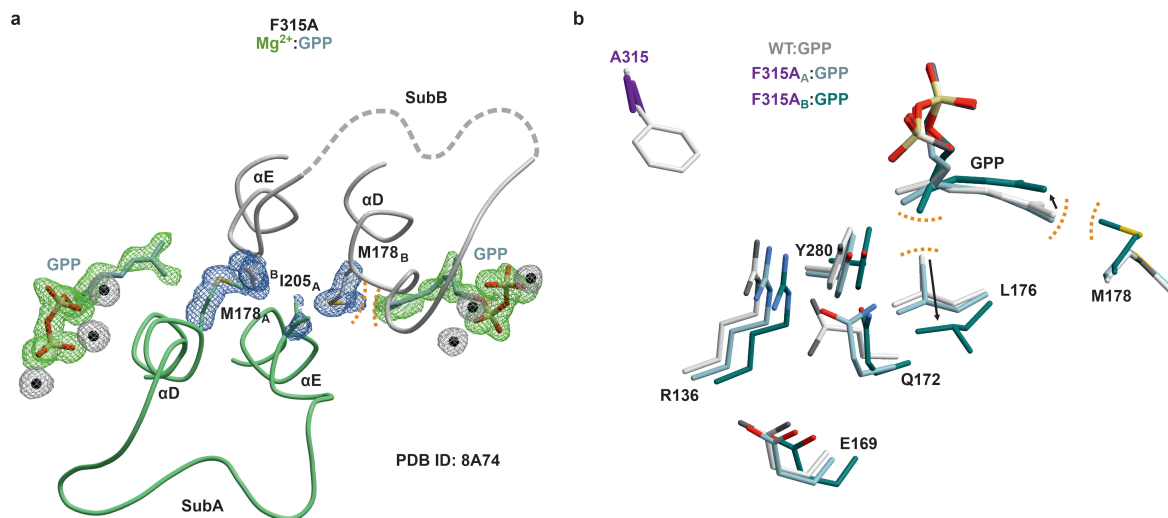


Abbildung 17. GPP_{AI} unterbricht den Substratloop in der benachbarten Untereinheit. a, $PcIDS1_F315A_{Mg}:2GPP$: In Anwesenheit von GPP_{AI} in SubA (grün) wird die Koordination von IPP_{HAI} in SubB (grau) verhindert. Das FARM am unterbrochenen Substratloop behält die Affinität für allylische Liganden bei. GPP_{AI} nimmt eine unphysiologische, geknickte Konformation in SubB an, um sterische Zusammenstöße (orange gestrichelt) mit $M178$ zu vermeiden. **b, Überlagerung von $PcIDS1_{Mg}:GPP$ (grau) mit SubA und SubB von $PcIDS1_F315A_{Mg}:GPP$ (cyan und türkis):** In Abwesenheit der Phenylseitenkette werden im regulatorischen Netzwerk zwischen $R136$, $E169$, $Q172$ und $Y280$ Umlagerungen beobachtet. Die geknickte Konformation des Prenyls in $F315A_B$ verdrängt $L176$ mit seiner 3-Methylgruppe (Pfeile). C_5 -Liganden würden jedoch nicht mit $M178$ und $L176$ interferieren und könnten in Gegenwart von GPP_{AI} weiterhin an SubB binden. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

4.1.6. ZOL erzwingt Dimersymmetrie

Die Asymmetrie der GPP-Komplexe steht im Kontrast zur IPP-Struktur, in der zwar ebenfalls keine identische Besetzung der aktiven Zentren vorliegt, allerdings beide Substratloops geordnet sind. Um zu untersuchen, ob beide Untereinheiten von *PcIDS1* in Gegenwart von C₅-Substraten in den geschlossenen, katalytischen Zustand übergehen können, wurde der starke Inhibitor ZOL eingesetzt. Dieser erhöht die Proteinstabilität im TSA deutlich, interferiert aber nicht mit der Bindung von IPP_{HAL}. Des Weiteren zeigt sich ein signifikanter Einfluss der Mg²⁺_B-Koordination an D319 auf den *PcIDS1*:ZOL-Komplex (Abb. 18a).

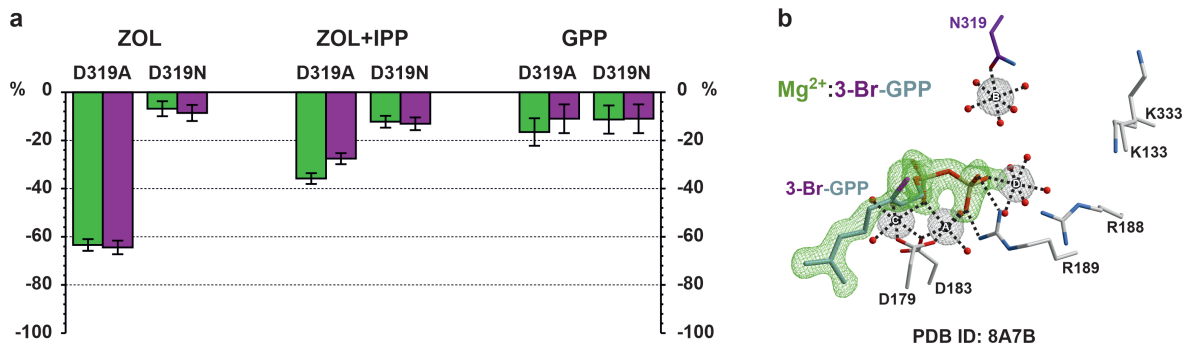


Abbildung 18. Einfluss der Mg²⁺_B-Bindestelle auf Proteinstabilität. a, Prozentuale Änderung der Schmelzpunktverschiebung (im Vergleich zu *PcIDS1* WT) für Proteinmutanten von D319 in Gegenwart von ZOL, ZOL+IPP und GPP. b, *PcIDS1*_D319N_{Mg}:3-Br-GPP: Der Inhibitor 3-Br-GPP bindet wie in *PcIDS1* WT. Im Gegensatz zu D319A kann die Amidgruppe Mg²⁺_B koordinieren. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

Verhindert man die Koordination von Mg²⁺_B durch Entfernung der Proteinbindestelle in D319A, nimmt die stabilisierende Wirkung von ZOL unabhängig von der Metallspezies um über 60 % ab. Erwartungsgemäß lässt sich dieser Effekt in der D319N-Mutante fast vollständig umkehren, die, wie die Kristallstruktur von *PcIDS1*_D319N_{Mg}:3-Br-GPP (PDB ID: 8A7B) zeigt, Mg²⁺_B analog zum WT koordiniert (Abb. 18b). Diese Beobachtung deutet an, dass ZOL allein in der Lage ist, durch Bindung an die A1-Stelle den geschlossenen Zustand herbeizuführen. Da die Zugabe von IPP im WT dennoch für einen weiteren Anstieg der Schmelztemperatur ($\Delta 9$ °C, Abb. 11) sorgt und den Effekt der Mutante D319A (-37%) abmildert, kann darauf geschlossen werden, dass ein direkter Zusammenhang zwischen der Stabilität des Metallionenclusters um den allylischen Liganden und der HAL-Bindestelle besteht. Liegt *PcIDS1* hingegen im offenen Zustand vor, also wenn beide D319-Mutanten mit GPP zusammengegeben werden, ist der Einfluss von Mg²⁺_B auf die Thermostabilität marginal. Tatsächlich zeigt die Struktur von *PcIDS1*_{Mg}:ZOL:IPP (PDB ID: 8A7C) hohe Symmetrie zwischen SubA und SubB (Tab. 20).

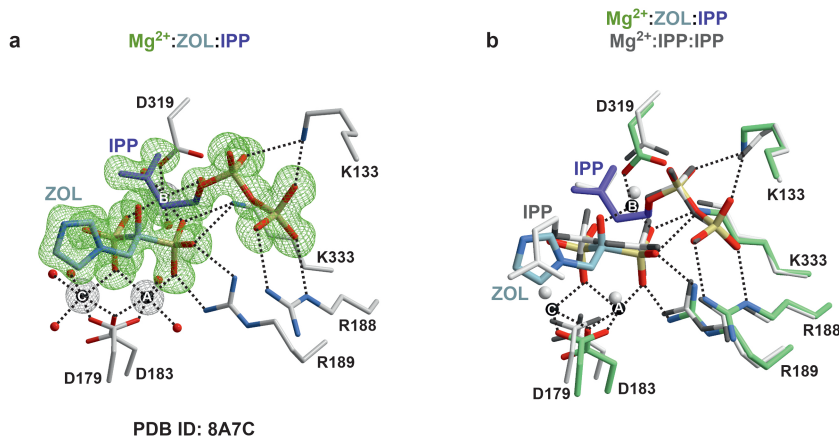


Abbildung 19. *PcIDS1* im Komplex mit ZOL und IPP. **a**, *PcIDS1*_{Mg}:ZOL:IPP: Das Bisphosphonat (BP) von ZOL imitiert die PP_{Al} Einheit und komplexiert drei Mg²⁺-Ionen in Gegenwart von IPP_{HAI}. **b**, Überlagerung von *PcIDS1*_{Mg}:ZOL:IPP und *PcIDS1*_{Mg}:IPP:IPP: Der Inhibitor ahmt den Bindemodus des C₅-Liganden nach. Die starre, ekliptische Konformation von BP und die zusätzliche Hydroxylgruppe verursachen geringfügige Umlagerungen im aktiven Zentrum. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

Im Vergleich zu *PcIDS1*_{Mg}:IPP:IPP hat ZOL in dieser Kristallstruktur das allosterisch gebundene IPP-Molekül von der Al-Stelle verdrängt (Abb. 19a). Die protonierte Imidazolgruppe von ZOL_{Al} imitiert die Ladung des naszierenden Carbokations von DMAPP_{Al}, während die zentrale Hydroxymethylgruppe die Bisphosphonateinheit (BP) in eine feste Konformation zwingt. Mit seinen vier negativen Ladungen ähnelt BP dabei stets dem ekliptischen PP_{Al} im geschlossenen Zustand (Abb. 19b). Hierdurch werden die drei Metallionen (A-C) rekrutiert und die Bildung des Substratloops sowie die IPP_{HAI}-Bindung begünstigt. Dies zeigt, dass beide Untereinheiten gleichzeitig geschlossen vorliegen können und die Affinität für IPP_{HAI} direkt mit der Bindungsstärke der allylischen Liganden korreliert. In Anwesenheit von DMAPP_{Al} könnte die Reaktion somit in beiden aktiven Zentren ablaufen und würde, im Gegensatz zur FPP-Synthese, zusätzlich durch die Kooperativität der Substratloops begünstigt.

4.1.7. Mn²⁺ steigert die Ligandenaffinität

Um die Bindung der SMI zu charakterisieren, wurde die Struktur von *PcIDS1*_{Mn}:ZOL:IPP (PDB ID: 8A7J) bestimmt. Obwohl hierbei, ähnlich wie bei den TSA-Versuchen, stets ein 5:1-stöchiometrischer Überschuss an MgCl₂ über MnCl₂ vorlag, wurde für alle drei Metallpositionen ein starkes anomales Signal beobachtet (Abb. 20a). Aufgrund des starren Bindemodus des Inhibitors ZOL ist die Struktur ansonsten zu *PcIDS1*_{Mg}:ZOL:IPP identisch (Abb. 20b, Tab. 20).

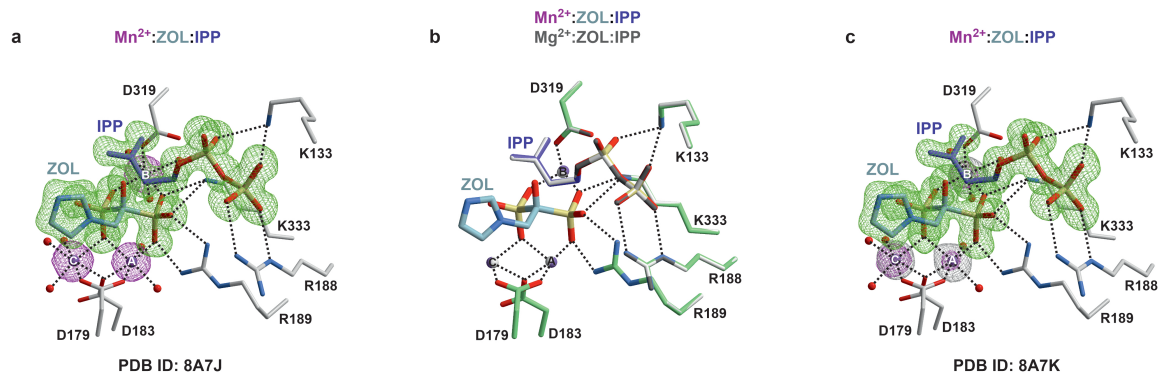


Abbildung 20. Mn^{2+} bindet in Gegenwart von ZOL und IPP an die A1-Stelle. a, In Anwesenheit von Mn^{2+} werden die Metallbindestellen A-C bevorzugt durch SMI besetzt. **b,** Überlagerung von $PcIDS1_{Mn}:ZOL:IPP$ und $PcIDS1_{Mg}:ZOL:IPP$: Es werden keine Bewegungen im aktiven Zentrum beobachtet. **c,** $PcIDS1_{Mn/Mg}:ZOL:IPP$: Erhöht man den Überschuss von Mg^{2+} über Mn^{2+} auf 50:1, werden Mn^{2+}_A und Mn^{2+}_B teilweise verdrängt, Mn^{2+}_C bleibt allerdings die dominante Metallspezies. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

Um zu untersuchen, wie die Metallionenkonzentration der Umgebung die Affinität für Mn^{2+} beeinflusst, wurde eine zweite Struktur in Gegenwart eines 50-fachen Überschusses an Mg^{2+} bestimmt (PDB ID: 8A7K, Abb. 20c). Auch hier sind anomale Signale für alle drei Metalle zu beobachten, wobei jenes für Mn^{2+}_C am deutlichsten ausfällt. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die jeweiligen Metalle an A und B bereits in Lösung in eine starre, zweizählige Koordination mit der BP-Gruppe von ZOL eintreten. Die hohe Mg^{2+} -Konzentration, sowie das molare Verhältnis zwischen $MnCl_2$ und ZOL (1:1), reduzieren allerdings die Wahrscheinlichkeit, dass ein ungebundenes ZOL-Molekül mit zwei oder drei Mn^{2+} -Ionen interagiert. Bindet solch ein Ligand mit seinem Metallcluster in die A1-Stelle, kann lediglich auf Mn^{2+}_C durch Wechselwirkungen mit dem FARM selektioniert werden. Insgesamt zeigt $PcIDS1$ eine hohe Selektivität für SMI, die stärkere Komplexe mit Liganden und Enzym bilden als Mg^{2+} , wodurch die Ionisierung der PP-Einheit erhöht wird.^{118,119}

Der erzwungene, geschlossene Zustand des ZOL_{A1} -Komplexes lässt keine Rückschlüsse auf das metallabhängige Zusammenspiel zwischen der A1- und HA1-Stelle zu. Um die Bindung von Mn^{2+} in einem nativen Komplex zu untersuchen, wurde deshalb IPP_{A1} als $DMAPP_{A1}$ -Surrogat eingesetzt. Die Struktur von $PcIDS1_{Mn}:IPP:IPP$ (PDB ID: 8A6Z) bildet dabei ein symmetrisches, geschlossenes Dimer mit IPP_{A1} und IPP_{HA1} , analog zu SubB in $PcIDS1_{Mg}:IPP:IPP$ (Abb. 21).

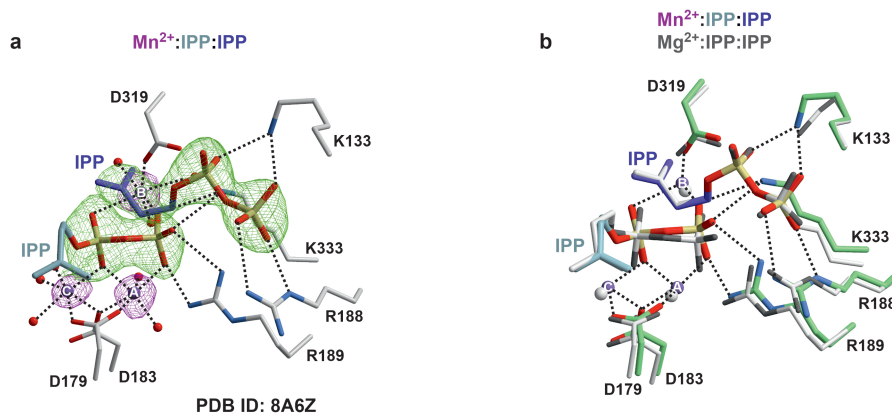


Abbildung 21. Mn^{2+} stabilisiert den geschlossenen Zustand mit IPP. **a**, Alle drei Metallpositionen weisen ein gleichmäßiges, anomales Signal für Mn^{2+} auf. Ähnlich wie im Mg^{2+} -Komplex ist die Isoprenyleinheit von IPP_{AI} flexibler als die des nativ gebundenen IPP_{HA1} . **b**, Die Konfiguration des aktiven Zentrums im geschlossenen Zustand ist metallunabhängig. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

Im Gegensatz zur Struktur mit ZOL_{AI} weisen die Metallpositionen hier eine einheitliche anomale Dichte auf, trotz eines 100-fachen Überschusses von Mg^{2+} zu Mn^{2+} im Kristallisationspuffer (Tab. 16). Dies lässt sich mit der prozeduralen Bindung der nativen Liganden erklären: In Abwesenheit von IPP_{HA1} erlaubt die gestaffelte Konfiguration von PP_{AI} die Selektion auf Mn^{2+} in den Positionen A und C. Sobald IPP die HA1-Stelle besetzt, wird auch Mg^{2+}_B durch das SMI ersetzt, welches die ekliptische Ausrichtung und Ionisierbarkeit von PP_{AI} durch höhere Elektronegativität begünstigt. Die Symmetrie der Kristallstruktur zeigt, dass *PcIDS1* auch mit seinen nativen Substraten beide aktive Zentren zeitgleich besetzen kann.

Um die Mn^{2+} -Bindung im asymmetrischen Zustand des Enzyms zu charakterisieren, wurde die Struktur von *PcIDS1*_{Mn} mit GPP_{AI} (PDB ID: 8A73) bestimmt (Abb. 22a). Wie im Mg^{2+} -Komplex ist der Ligand hier nur an SubA gebunden und beide Untereinheiten befinden sich im offenen Zustand. Während Mn^{2+}_A und Mn^{2+}_C GPP_{AI} koordinieren, bleibt Mg^{2+}_B die dominante Spezies im pentameren Wassercluster. Erstaunlicherweise lässt sich in dieser Struktur keine Elektronendichte an Position D wie in den Mg^{2+} -Komplexen beobachten (Abb. 22b). Offenbar reduziert die stärkere Lewis-Azidität der SMI die Ladungsdichte von PP_{AI} und verhindert die Koordination von Mg^{2+}_D . Gleichzeitig schwächt dies die Salzbrücke zu R188, wodurch sich P_β um 0,8 Å in Richtung des SARM verschiebt um dort mit der Hydratationssphäre von Mg^{2+}_B zu interagieren (Abb. 22c und d).

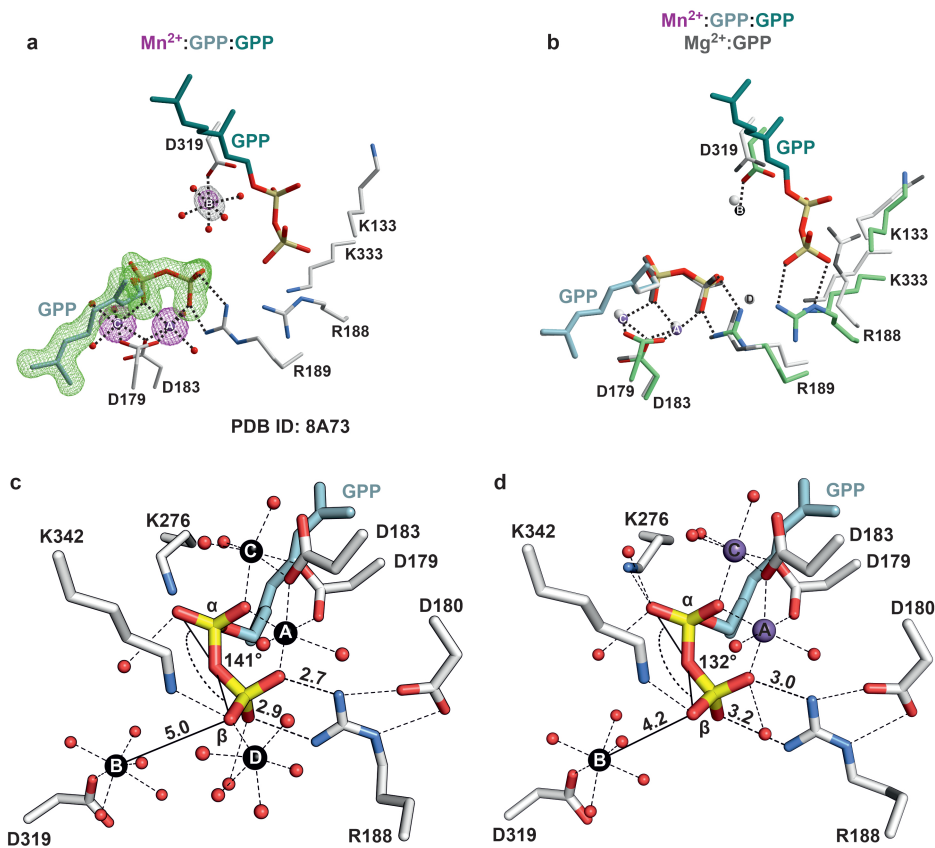


Abbildung 22. Mn^{2+} bindet GPP_{Al} im offenen Zustand und vermittelt allosterische Regulation. **a**, $PcIDS1_{Mn}:GPP:GPP$: Mn^{2+} besetzt die Metallbindestellen, wobei Mg^{2+}_B die dominierende Spezies bleibt. Die Position von Mg^{2+}_D bleibt vakant. In Abwesenheit von IPP_{HAI} , bindet R188 ein zweites GPP-Molekül. **b**, Überlagerung von $PcIDS1_{Mn}:GPP:GPP$ und $PcIDS1_{Mg}:GPP$: In Abwesenheit von Mg^{2+}_D verschiebt sich das SARM in Richtung PP_{Al} . **c**, $PcIDS1_{Mg}:GPP$ zeigt vier Metallbindungsstellen um PP_{Al} . P_β bildet starke H-Brücken zu R188 aus und koordiniert Mg^{2+}_D . **d**, $PcIDS1_{Mn}:GPP:GPP$: Die Lewis-Azidität der SMI an A und C verringert die Ladungsdichte von P_β und schwächt die Wechselwirkung mit R188. Dadurch kann Mg^{2+}_D nicht binden, wodurch sich der Abstand zwischen PP_{Al} und Mg^{2+}_B um 0,8 Å verringert. Diese Umlagerungen fördern den Übergang in die ekliptische Konformation des allylischen Liganden. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

Diese Bewegungen richten die Untereinheit für die Koordination von IPP_{HAI} aus und erleichtern den Übergang in den geschlossenen Zustand. Damit verstärken SMI den intramolekularen Effekt, der die Ausbildung der HAI-Stelle fördert, sobald ein Ligand an Al koordiniert. Diese Kooperativität besteht während der GPP-Synthese in beiden HAI-Stellen, ist jedoch bei der Bildung von FPP auf eine Untereinheit (SubA) beschränkt. Bindet nun GPP_{Al} in Gegenwart von SMI in SubA, könnte $DMAPP_{Al}$ trotzdem an SubB koordinieren (Abb. 17a) und dort die Affinität für IPP_{HAI} erhöhen. Ordnet sich nun der Substratloop von SubB, würde dies eine Rückkopplung auf SubA auslösen und dort die FPP-Bildung unterbinden (Abb. 15e).

4.1.8. Die allosterische Regulation von *PcIDS1*

Wie Abb. 22a und 23a zeigen, ist in der Struktur von $PcIDS1_{Mn}:GPP:GPP$ gut definierte Elektronendichte für ein zweites GPP-Molekül (GPP_{Allo}) vorhanden. Die Prenyleinheit des Liganden ragt dabei in einen 7 Å breiten und 15 Å tiefen Kanal zwischen αC , αG sowie αJ in SubA. V286 und I420 bilden den Boden dieser Bindetasche und fungieren als molekulares Lineal, während F282 und F315 mit beiden Allylgruppen π - π -Wechselwirkungen eingehen.

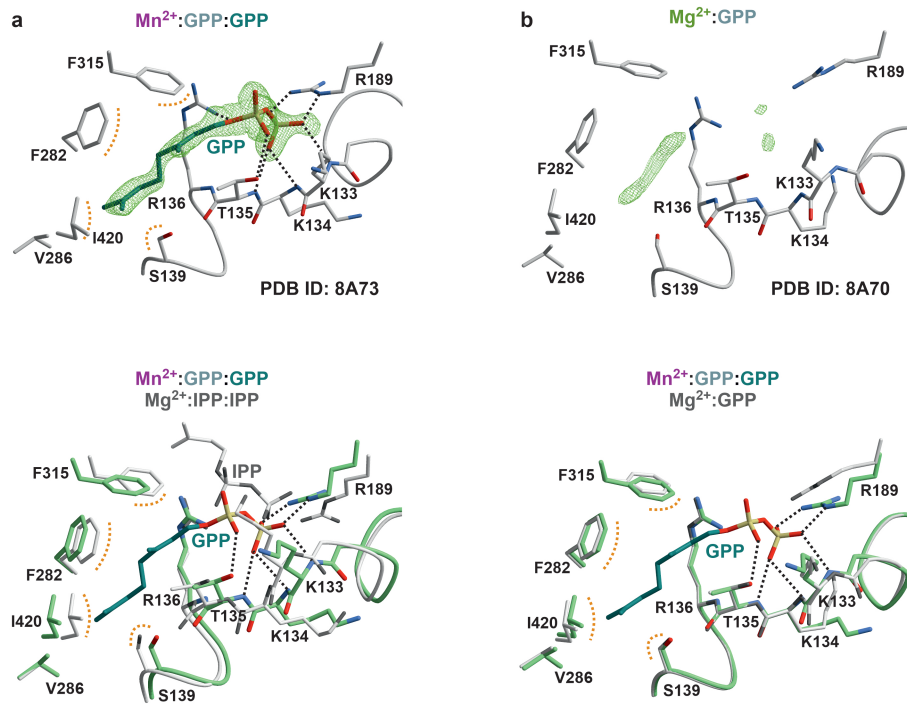


Abbildung 23. Strukturanalyse der allosterischen Stelle in *PcIDS1*. **a**, *PcIDS1*_{Mn}:GPP:GPP (oben): In Gegenwart von Mn^{2+} bindet GPP in eine allosterische Tasche zwischen αC , αG und αJ . Hydrophobe und sterische Wechselwirkungen sind durch gestrichelte, orange Linien dargestellt. Überlagerung von *PcIDS1*_{Mn}:GPP:GPP und *PcIDS1*_{Mg}:IPP:IPP (unten): Die HAI-Stelle ordnet sich zur Bindung von GPP_{Allo} um. Die PP_{Allo} -Einheit koordiniert R189 und verankert P_{β} am N-Terminus von αC . π - π -Wechselwirkungen zwischen den Prenyl-Doppelbindungen und F282 sowie F315 vermitteln Ligandenselektivität. **b**, *PcIDS1*_{Mg}:GPP (oben): GPP_{Allo} bindet nicht, wenn GPP_{AI} über Mg^{2+} koordiniert wird. Diffuse Elektronendichte im allosterischen Kanal deutet auf unspezifische Affinität für apolare Moleküle hin. Überlagerung von *PcIDS1*_{Mn}:GPP:GPP und *PcIDS1*_{Mg}:GPP (unten): Die Seitenketten zur Koordination von PP_{HAI}/PP_{Allo} sind im Mg^{2+} -Komplex flexibel. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

Die PP-Einheit von GPP_{Allo} koordiniert Seitenketten der HAI-Bindestelle und des Substratloops, wodurch es einen kompetitiven Inhibitor für IPP_{HAI} darstellt. Während R136 mit beiden Phosphaten interagiert, positioniert sich P_{β} am Dipol der αC -Helix und bildet eine Salzbrücke mit R189. GPP_{Allo} hält die Untereinheit in der offenen Konformation, indem es wie ein Keil die Beweglichkeit der C-terminalen Domäne einschränkt. Dennoch ist der C-Terminus vollständig geordnet und nimmt zusammen mit der Region 328-331 eine ähnliche Konformation wie im geschlossenen Komplex mit IPP_{HAI} ein. Für einige der Seitenketten, die sich während der IPP_{HAI} -Bindung umorientieren, sind dabei Alternativkonformationen zu erkennen (Abb. 24).

die Koordination von Mg^{2+}_D . Die Struktur von $PcIDS1_{I420A}_{Mg}:GPP:MES$ unterstreicht die hohe Spezifität für GPP_{Allo} durch hydrophobe Interaktionen im Bindekanal zwischen den angrenzenden Helices.

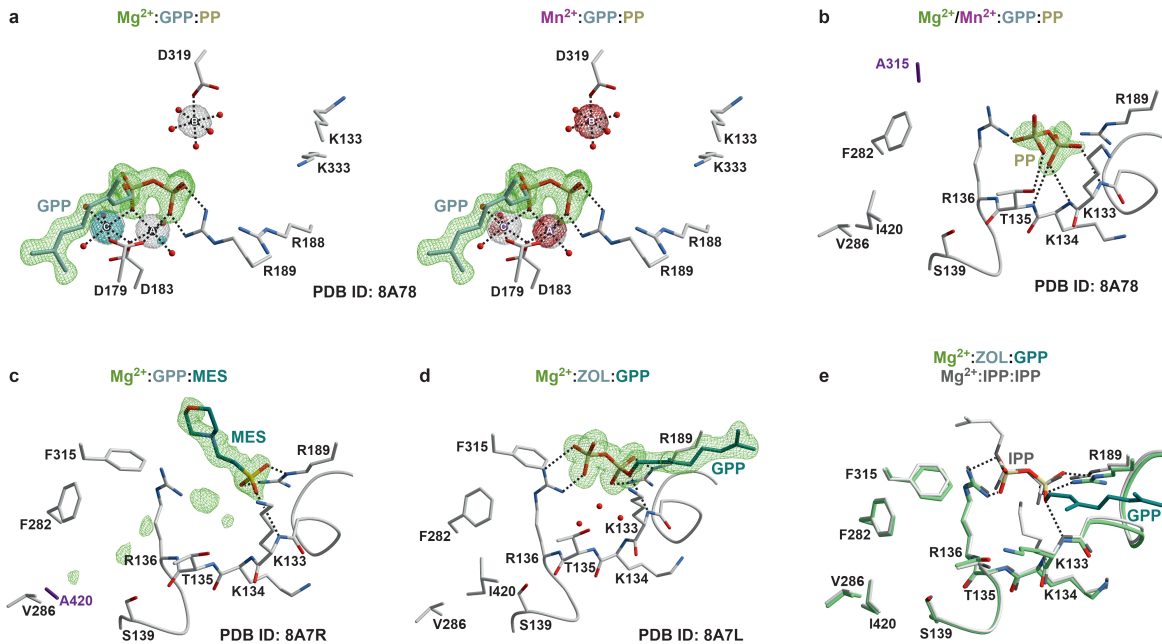


Abbildung 25. Veränderungen im aktiven Zentrum stören GPP_{Allo} -Koordination.

a, $PcIDS1_{F315A}_{Mg/Mn}:GPP:PP$: Die Kristallisation erfolgte in Gegenwart von Mn^{2+} ; Mg^{2+}_D wird nicht beobachtet. Links: Wenn den Metallpositionen A-C Mg^{2+} zugewiesen wird, ergibt sich bei C positive F_O-F_C -Elektronendichte (cyan). Rechts: Ersetzt man Mg^{2+} durch Mn^{2+} , sind negative F_O-F_C -Signale (rot) für A und B zu beobachten. Daher werden A und B als Mg^{2+} , und C als Mn^{2+} ausgewiesen. **b**, In derselben Struktur deutet diffuse Elektronendichte an der HAI-Bindestelle die Anwesenheit von PP_{Allo} an. Die Prenyleinheit von GPP_{Allo} ist ohne die Phenylgruppe von F315 undefiniert. **c**, $PcIDS1_{I420A}_{Mg}:GPP:MES$: Der allosterische Bindekanal dieser Variante ist tiefer, bindet aber kein GPP_{Allo} mehr. Ein MES-Molekül besetzt die HAI-Stelle und verhindert die Bindung von Mg^{2+}_D . **d**, $PcIDS1_{Mg}:ZOL:GPP$: ZOL_{AI} zwingt die Untereinheit in den geschlossenen Zustand und rekrutiert GPP in einer nichtphysiologischen, allosterischen Koordination. **e**, Überlagerung von $PcIDS1_{Mg}:ZOL:GPP$ und $PcIDS1_{Mg}:IPP:IPP$: Die PP_{HAI} -Einheiten beider Liganden zeigen einen einheitlichen Bindungsmodus mit invertierten α - und β -Positionen. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

GPP_{Allo} bindet demnach in ein Netzwerk, das während der Katalyse für die Domänenbewegung des SARM sowie die Stabilisation des C-Terminus wesentlich ist. Um festzustellen, ob eine allosterische Bindung dem geschlossenen Zustand entgegenwirkt, wurde erneut der Inhibitor ZOL eingesetzt. In Abwesenheit des natürlichen Substrats IPP kann GPP zwar binden, allerdings nicht in die nun verschlossene, allosterische Tasche (Abb. 25d). Stattdessen nimmt die PP-Gruppe die Konformation von IPP_{HAI} ein, allerdings unter Inversion der Phosphatgruppen, sodass die Geranyleinheit zur Proteinoberfläche zeigt (Abb. 25e). Obwohl es sich hier nicht um einen nativen Komplex handelt, verdeutlicht der Bindemodus die kompetitive Wirkung von GPP auf IPP_{HAI} auf die Katalyse.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass der intramolekulare Effekt, den die Koordination von SMI an der A1- auf die HAI-Stelle ausübt, auch für die Rekrutierung von GPP_{Allo} verantwortlich ist. Dieser Ligand inhibiert wiederum die Bindung von IPP_{HAI} kompetitiv und hält die Untereinheit in der offenen Konformation.

4.2. MstE aus *Scytonema*

4.2.1. Klonierung, Expression und Reinigung

Das MstE-Gen wurde entsprechend den Angaben in *Material und Methoden* in einen pET28b-His₆-SUMO-Vektor über die Restriktionsschnittstellen BamHI und PstI einkloniert. Im Gegensatz zu *PcIDS1* verlief die Reinigung und Konzentration des monomeren Volllängen-Proteins unkompliziert, was mit seinem bakteriellen Ursprung und der cytosolischen Lokalisation korreliert.

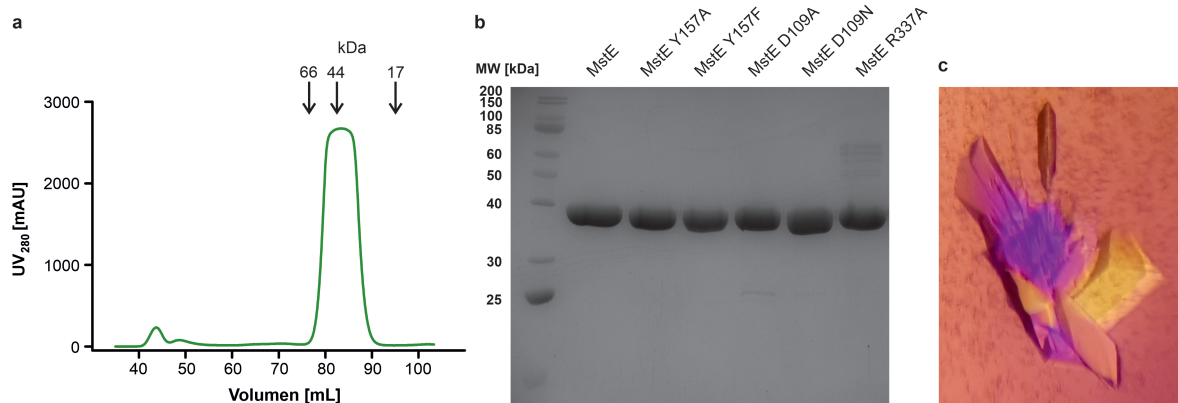


Abbildung 26. Reinigung und Kristallisation von MstE. a, Größenausschlusschromatographie von MstE Wildtyp unter Verwendung einer Superdex 200 16/60 Säule. Die entsprechenden Retentionsvolumina verschiedener Standardproteine sind gemäß der Herstellerangaben aufgetragen. MstE ist ein Monomer, das bei 82 mL eluiert. b, Die Analyse mittels SDS-PAGE zeigt, dass alle gereinigten Proteinvarianten der erwarteten Größe von 40 kDa entsprechen. Auf jede Spur wurden 5 µg Protein aufgetragen. c, Ein typischer MstE-Kristall, betrachtet unter einem Lichtmikroskop mit Polarisationsfilter. Darstellung in Anlehnung an Moosmann et al.⁸²

Die Peaks der SEC-Läufe von MstE WT, sowie aller im Laufe der Arbeit generierten Mutanten, zeigten einen scharfen, einzelnen Peak bei 82 mL, was dem hydrodynamischen Volumen eines Monomers entspricht (Abb. 26a). Geringfügige Verunreinigungen konnten effektiv abgetrennt werden (Abb. 26b). Das Einfrieren mit flüssigem Stickstoff zeigte keinen negativen Effekt auf die Kristallisationstendenz nach Lagerung und Auftauen.

4.2.2. Kristallisation und Strukturbestimmung

Kristallisationsansätze wurden analog der in *Material und Methoden* beschriebenen Sitting-Drop-Dampfdiffusions-Methode durchgeführt. Die Kristallisation des Apo-Proteins erwies sich als schwierig, da Kristalle nur aus wenigen Bedingungen gewonnen werden konnten und diese stets in Büschelform auftraten. In Ansätzen mit Substrat oder Surrogat konnten hingegen schon nach wenigen Tagen große, quaderförmige Kristalle beobachtet werden (Abb. 26c).

Tabelle 17. Bedingungen für die Sitting-Drop-Kristallisation von MstE. Darstellung in Anlehnung an Moosmann et al.⁸²

Ansatz	Konz. [mg/mL]	Protein-Reservoir-Verhältnis [$\mu\text{L}/\mu\text{L}$]	Zusammensetzung des Reservoirs	Cofaktoren Liganden
MstE _{apo}	15	0.3 + 0.1	0.1 M Tris/HCl, pH 8.5 25% PEG 8000	
MstE:F _s -DHB	15	0.2 + 0.2	0.1 M Hepes, pH 7.0 4.0 M NaCl	Farnesyl-DHB
MstE_D109A:MA	15	0.2 + 0.2	0.1 M Hepes, pH 7.0 1.0 M LiCl 30% PEG 6000	GG-DHB → MA
MstE_D109N:GG-DHB	15	0.2 + 0.2	0.1 M Sodium acetate 1.0 M LiCl 30% PEG 6000	GG-DHB
MstE_Y157F apo	15	0.2 + 0.1	3.4 M Sodium formate, pH 6.5	
MstE_R337A:GG-DHB	15	0.2 + 0.2	0.5 M LiCl 1.6 M (NH ₄) ₂ SO ₄	GG-DHB

Die Strukturaufklärung von MstE apo gelang durch molekularen Ersatz mit einer bakteriellen Squalen-Hopen-Cyclase (PDB ID: 2SQC⁷⁸). Hierzu wurde die α -Domäne der Modellstruktur entfernt und das verbleibende α_6 - α_6 -Fass der β -Domäne auf ein Poly-Alanin-Modell reduziert. Wie die deutlich unterschiedliche Kristallmorphologie vermuten ließ, wies MstE_{apo} ein individuelles Kristallgitter in der Raumgruppe P1 auf. Die Auflösung war dabei etwa 0,5 Å schlechter als für die anschließend ermittelten Komplexstrukturen (Tab.19). Das verfeinerte MstE-Modell weist große Ähnlichkeit mit der konservierten β -Domäne der Terpencyclasen auf. Die Fassstruktur aus sechs äußeren (oH₁₋₆) und sechs inneren Helices (iH₁₋₆) bildet den Anker für zahlreiche Loops, sowie vier β -Faltblätter und eine kurze Helix (Abb. 27). Der beste Treffer einer DALI-Suche nach verwandten Strukturen war das verwendete Phasierungsmodell mit einem Z-Wert von 31,1 bei 21 % Sequenzidentität.¹¹¹

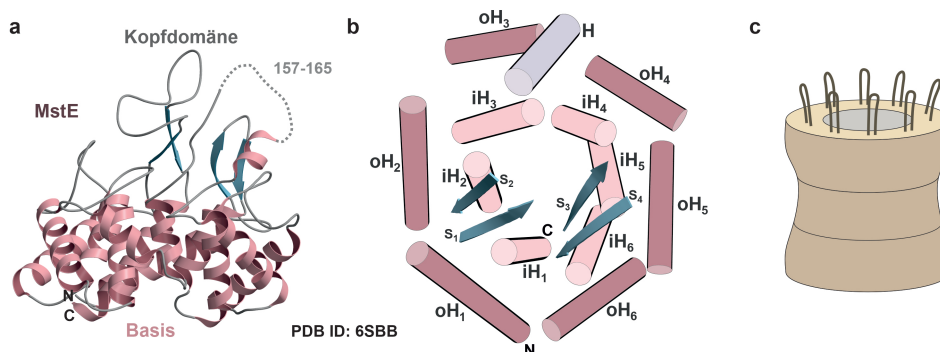


Abbildung 27. Proteinstruktur von MstE_{apo}. **a**, In der Cartoondarstellung lässt sich die konservierte helikale β -Domäne (pink) gut erkennen. Auf dieser Basis bildet sich eine ausgeprägte Kopfdomäne (grau), die größtenteils aus interhelikalen Loops mit wenigen Sekundärstrukturelementen besteht. **b**, Betrachtet man das Enzym von oben, zeigt sich die Fassstruktur der äußeren (oH) und inneren Helices (iH) deutlich. Die β -Faltblätter (S₁₋₄) und die zusätzliche Helix H bilden einen tiefen Kanal im Zentrum. **c**, Schema einer Strickliesel, an deren Form MstE erinnert. Darstellung in Anlehnung an Moosmann et al.⁸²

In MstE sind die ausgeprägten Loopstrukturen einseitig auf der helikalen Basis angeordnet und bilden eine Kopfdomäne, sodass die MstE-Architektur an eine „Strickliesel“ erinnert (Abb. 27c). Ähnlich wie bei diesem Handwerkzeug weisen die Loops, die sich jeweils zwischen dem C-Terminus einer oH und dem N-Terminus einer iH ausbilden, im Zentrum einen Kanal auf. Dieser ist 17 Å tief und überwiegend mit aromatischen Seitenketten ausgekleidet, die ihm ein negatives elektrostatisches Potential verleihen. Diffuse Dichte in dieser vermeintlichen Substratbindetasche lässt vermuten, dass hierdurch hydrophobe Moleküle (z.B. PEG) aus dem Kristallisationspuffer binden können. Die Aminosäuren 157 bis 165 am Eingang dieses Kanals sind in MstE_{apo} ungeordnet. Zwischen Basis und Kopfdomäne finden sich zwei Q-5x-W-Motive an den C-Termini von oH₄, bzw. oH₆ (Abb. 28d). Diese Strukturelemente sind häufig in SHC und OSC zu finden und vermitteln Stabilität am Helix-Rückgrat durch Wechselwirkungen zwischen den Tryptophan- und Glutaminseitenketten.^{84,120}

4.2.3. MstE bindet prenilyerte Dihydroxybenzoate

Zur weiteren Aufklärung des Reaktionsmechanismus wurde eine Co-Kristallstruktur von MstE und dem unreaktiven Surrogat Farnesyl-Dihydroxybenzoat (Fs-DHB) bestimmt. Die Verbindung ist vollständig in der 2F_O-F_C-Elektronendichtekarte definiert und befindet sich innerhalb des zentralen Kanals, wobei die C₁₅-Prenyleinheit zum Proteinkern orientiert ist. Die Hydroxylgruppen der DHB-Kopfgruppe bilden Wasserstoffbrücken mit E339, welches selbst wiederum durch R337 positioniert wird. Durch Aufnahme des Liganden ordnen sich die Aminosäurereste 157 bis 165 um den Eingang des aktiven Zentrums an und verhindern so den Eintritt von Wasser während der Katalyse, das mit den naszierenden Carbokationen reagieren könnte (Abb. 28a).

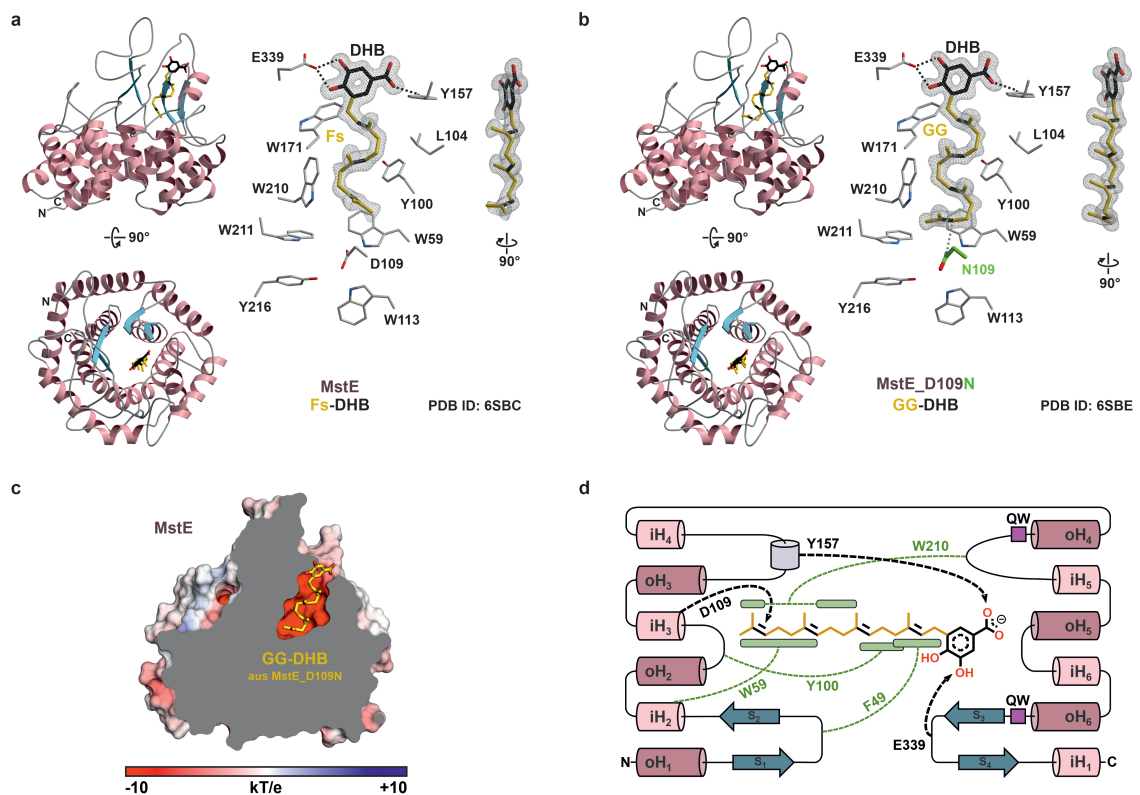


Abbildung 28. Fs-DHB und GG-DHB im Substratkanal von MstE. a, Links: Unterschiedliche Ansichten von MstE:Fs-DHB als Cartoonmodell. Das Surrogat Fs-DHB (gelb, DHB und Doppelbindungen in schwarz) bindet

zentral in die Kopfdomäne und ordnet die Region 157-165. Rechts: Aromatische und aliphatische Seitenketten des Substratkanals richten die Farnesyleinheit aus. Die DHB-Kopfgruppe wird zwischen Y157 und E339 arretiert. Die $2F_{\text{O}}-F_{\text{C}}$ -Elektronendichtekarte (grau, konturiert auf $1,0 \sigma$) ist für den gesamten Liganden definiert, wobei die endständige Allylgruppe einen höheren Temperaturfaktor aufweist. Das seitliche Profil von Fs-DHB veranschaulicht die parallele, einseitige Orientierung aller Methylreste. **b**, Die Struktur von MstE_D109N:GG-DHB dargestellt analog zu a. Das native Substrat ist eine Prenyleinheit länger als Fs-DHB und erreicht so den Boden der Bindetasche. Dort nimmt N109 (grün) den Platz der Brønsted-Base D109 ein, ohne dabei katalytisch aktiv zu werden. Der Ligand (rechts) ist nun ideal für die Zyklisierungskaskade ausgerichtet. **c**, Die elektrostatische Oberfläche eingefärbt von negativ (rot) bis positiv (blau) von MstE_{apo} verdeutlicht die elektronenreiche Auskleidung der Spezifitätstasche. Der Ligand (gelb) wurde aus der überlagerten D109N-Struktur eingefügt. **d**, Die Topologie des MstE-Monomers analog zu Abb. 27b. Pfeile geben die Interaktionen mit dem Substrat in grün (aromatisch) und schwarz (polar) wieder. Lila Quadrate symbolisieren die stabilisierenden QW-Motive der helikalen Basis. Darstellung in Anlehnung an Moosmann et al.⁸²

Die Struktur von MstE:Fs-DHB zeigt deutlich, dass das verkürzte Surrogat den Boden der Bindetasche nicht erreicht und die endständige Allylgruppe eine deutlich erhöhte Flexibilität aufweist. Da DHB spezifisch durch ein polares Netzwerk erkannt und verankert wird, ist der Abstand der C₁₂-C₁₃-Doppelbindung zur D109-Seitenkette des DxD-Motifs zu groß für die Protonierung. Aus diesem Grund wurde das natürliche Substrat GG-DHB zusammen mit der Proteinmutante MstE_D109N kristallisiert, deren Asparaginseitenkette zwar ähnliche Eigenschaften aufweist wie D109, dabei aber nicht als Brønsted-Säure agiert. Tatsächlich bindet der Ligand mit seiner C₂₀-Prenyleinheit analog zu Fs-DHB, wobei er den Kanal vollständig ausfüllt (Abb. 28b). In Übereinstimmung mit der stereoisomeren Konfiguration des polyzyklischen Produkts (Abb. 9) nimmt das Kohlenstoffgerüst dabei bereits eine sesselartige Konformation an. Der gestauchte Bindemodus, sowie die sterisch ungünstige, einseitige Ausrichtung aller Methylreste wird durch die starken Protein-Ligand-Wechselwirkungen ermöglicht (Abb. 28c und d).

4.2.4. Das Produkt Merosterolsäure verbleibt im Enzym

Durch ortsgerichtete Mutageneseexperimente gelang die Co-Kristallisation des Produkts Merosterolsäure A (MA) mit MstE_D109A, obwohl zu den Kristallansätzen lediglich GG-DHB zugegeben wurde. Während das lineare Substrat den gesamten Kanal mit seiner Tiefe von 17 Å einnimmt, ist das Produkt auf 12 Å kondensiert und durch sterische Abstoßung der Methylreste stark gekrümmt (Abb. 29a). In Abwesenheit der Carbonsäuregruppe von D109 besetzt ein 2-Methyl-2,4-pentandiol-Molekül (MPD) den geräumigen Kanalboden. Dessen Hydroxylgruppen ahmen dabei die funktionellen Sauerstoffe von D109 aus dem WT-Enzym nach, während das Pentanrückgrat hydrophobe Kontakte zu MA aufbaut. Die DHB-Einheit des zyklischen Produkts verliert die Wasserstoffbrücke zwischen seiner *meta*-Hydroxylgruppe und E339, das sich R337 zuwendet. Durch diese Umlagerungen gehen die Aminosäurereste 330 bis 335 in einen ungeordneten Zustand über. Gleichzeitig bricht das DHB-Carboxylat die Planarität zum Benzolring aufgrund sterischer Konflikte mit der neu gebildeten Cyclopentaneinheit. Dies zwingt Y157 zu einer 90°-Drehung unter Aufgabe der Wasserstoffbrücke und bringt die C_β-Position der Seitenkette in Kontakt mit den Methylgruppen des Liganden. Somit vermittelt Y157 nicht nur Selektivität während der Substratbindung, sondern erleichtert gleichzeitig als Gatekeeper die Freisetzung des Produkts.

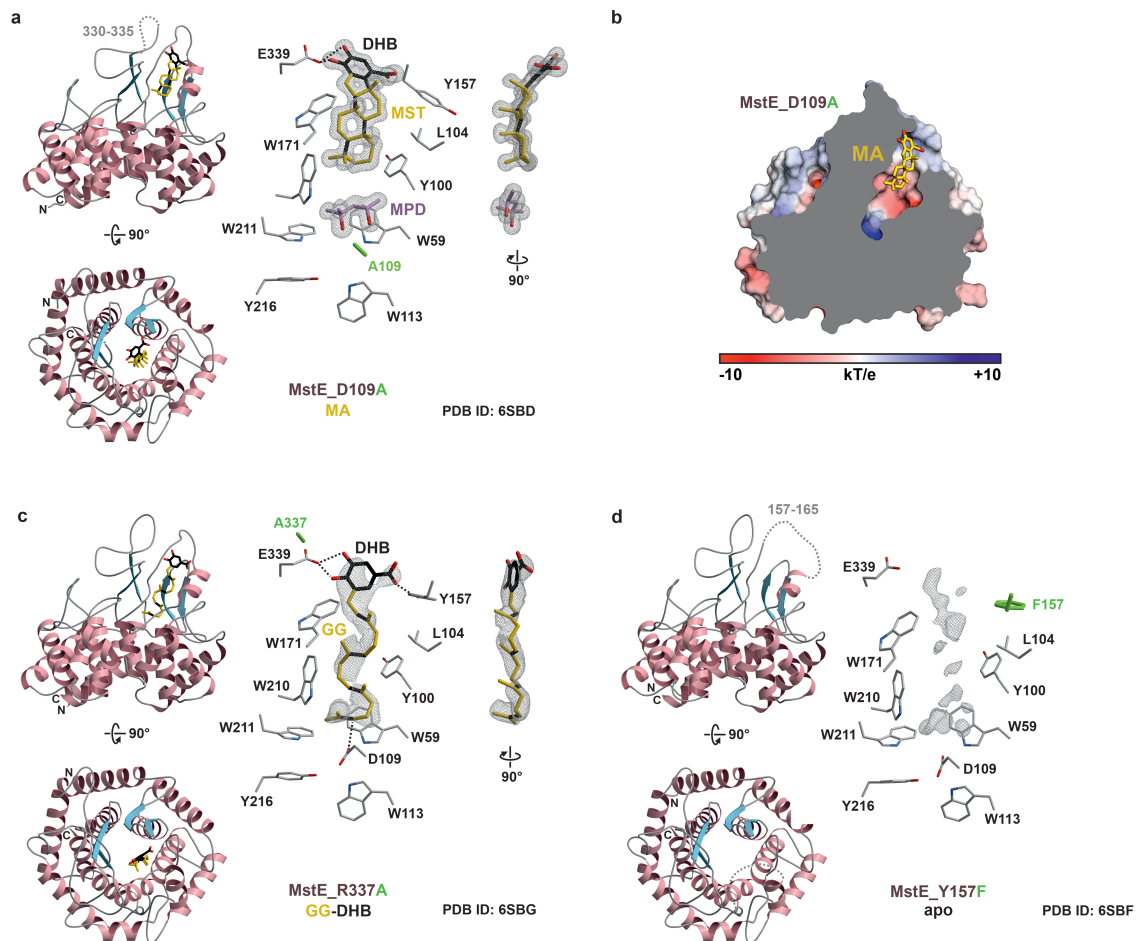


Abbildung 29. MstE bindet sein Produkt Merosterolsäure A. **a**, Links: MstE_D109A:MA als Cartoonmodell aus Seiten- und Vogelperspektive. Rechts: Das Produkt MA (gelb, neu gebildete C-C-Bindungen in schwarz) verbleibt im hydrophoben Kanal, verliert aber den Kontakt zu Y157. Ein MPD-Molekül besetzt den Boden der Substratbindetasche. Die $2F_o-F_c$ -Elektronendichtekarte (grau, konturiert auf $1,0 \sigma$) ist für beide Liganden gut definiert. Das seitliche Profil von MA veranschaulicht die Krümmung des Produkts durch die Abstoßungen der Methylgruppen. **b**, In Abwesenheit von D109 und in Gegenwart des Produkts verringert sich die Ladungsdichte der Spezifitätstasche in MstE_D109A:MA. **c**, Links: Strukturmodelle von MstE_R337A:GG-DHB. Rechts: Wenn E339 nicht durch R337 stabilisiert wird, ist das gesamte Substrat flexibler und schlechter in der $2F_o-F_c$ -Elektronendichtekarte definiert. **d**, Links: Cartoondarstellung von MstE_Y157F_{apo}. Rechts: Ohne die Wasserstoffbrücke zwischen Y157 und DHB ist kein Ligand in der Kristallstruktur definiert und die $2F_o-F_c$ -Elektronendichte bleibt diffus. Darstellung in Anlehnung an Moosmann et al.⁸²

Um die Rolle der DHB-Koordination auf die Katalyse zu charakterisieren, wurden die MstE-Mutanten R337A, Y157F, sowie Y157A mit GG-DHB zur Co-Kristallisation angesetzt. In der Struktur von MstE_R337A ist das Substrat deutlich schlechter definiert als im WT-Enzym, was auf eine höhere Flexibilität schließen lässt, da die Interaktion zwischen E339 und DHB beeinträchtigt wird (Abb. 29c). Nur noch diffuse Elektronendichte weist das aktive Zentrum nach Modifikation der Gatekeeper-Position 157 in MstE_Y157F auf (Abb. 29d). Hier ist die Seitenkette von F157 im Gegensatz zu MstE_{apo} geordnet, jedoch kann der Benzolring keine Wechselwirkung mit der DHB-Einheit mehr eingehen. Eine Komplexstruktur von MstE_Y157A konnte nicht bestimmt werden, da keine Kristalle mit ausreichender Beugungskraft erhalten wurden.

4.2.5. Manipulation des Produktspektrums

Parallel zu den Kristallisationsexperimenten wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jörn Piel (ETH Zürich) Aktivitätsstudien mittels HPLC-MS durchgeführt.⁸² Hierzu wurden die Produkte aller verfügbarer MstE-Varianten nach einer Inkubationszeit von 16 h identifiziert und charakterisiert (Abb. 30a). Ein nahezu vollständiger Substratumsatz zu MA zeigte sich für MstE_WT, während für MstE_D109A eine minimale Restaktivität nachgewiesen wurde. Dies unterstreicht, dass sich eine kleine Menge MA im Kristallansatz bilden konnte, während MstE_D109N bevorzugt mit dem nicht umgesetzten Substrat kristallisierte. Da MstE_R337A die Reaktion unvollständig katalysiert, könnte eine Mischpopulation aus Substrat und Produkt die diffuse 2Fo-Fc-Elektronendichte des Liganden, sowie die limitierte Auflösung dieser Komplexstruktur erklären.

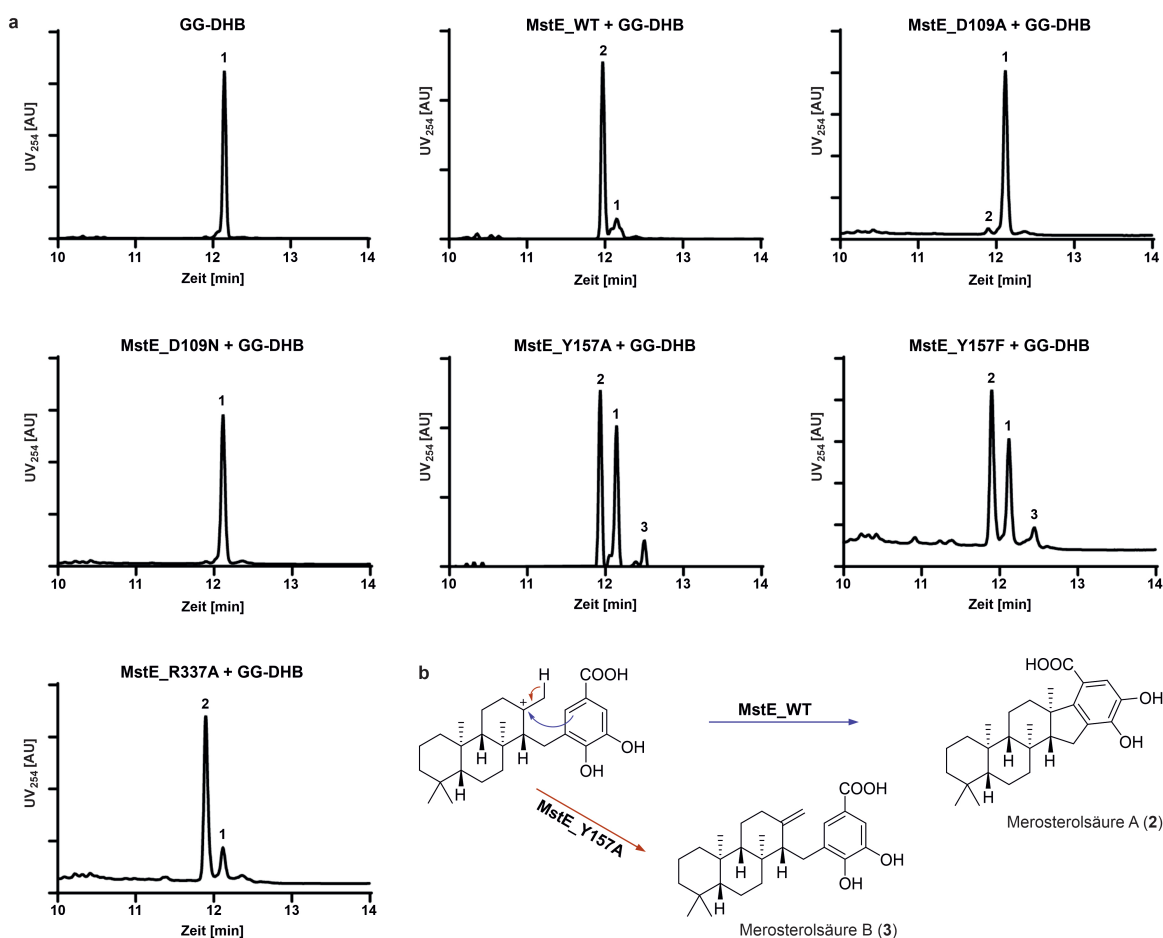


Abbildung 30. HPLC-Chromatogramme der Aktivitätsstudie und das von Moosmann et al. identifizierte alternative Produkt.⁸² **a**, Gezeigt ist das UV-Signal der Absorption bei 254 nm in willkürlichen Einheiten (AU) nach Inkubation der angegebenen MstE-Variante mit GG-DHB. Erhaltene Peaks wurden massenspektrometrisch charakterisiert und zugewiesen: GG-DHB (1), MA (2), MB (3). **b**, Postulierter Reaktionsmechanismus der Bildung von Merosterolsäure B. Wird die Koordination der DHB-Einheit beeinträchtigt, kann sich nach der dritten Ringbildung durch Deprotonierung eine *exo*-Methylengruppe bilden (rot). Im WT-Enzym findet hingegen stets die gesamte Zyklisierungskaskade durch Angriff der aromatischen π -Elektronen statt (blau). Darstellung in Anlehnung an Moosmann et al.⁸²

In Übereinstimmung mit den kristallographischen Befunden, haben Modifikationen an Y157 einen negativen Einfluss auf die katalytische Aktivität. Allerdings konnten für MstE_Y157A

und Y157F nicht nur Substrat- (1) und Produktpeaks (2) identifiziert werden, sondern auch kleine Mengen eines Nebenprodukts (3). Dieses wurde durch Moosmann et al. mithilfe massenspektroskopischer und umfassender NMR-Befunde (^1H , COSY, HSQC, HMBC, NOESY, ROESY) identifiziert und charakterisiert. Es handelt sich um ein trizyklisches Meroterpen, das vermutlich durch vorzeitige Deprotonierung der Methylgruppe am tertiären Carbokation vor der finalen Ringbildung entstanden ist (Abb. 30b). In Anlehnung an das Hauptprodukt MA wurde es Merosterolsäure B (MB) genannt und zeigt auf, dass Terpenzyklen durch gezieltes Proteindesign in ihrem Produktspektrum modifiziert werden können. Basierend auf diesen Befunden erstellten Moosmann et al. weitere Proteinvarianten, in denen die aromatische Auskleidung des Substratbindekanals verändert wurde, um die Zyklisierungskaskade zu beeinflussen. Bemerkenswerterweise wurde hierbei MB auch als Nebenprodukt von MstE_F338A identifiziert, da in dieser Variante keine π - π -Wechselwirkungen zwischen der DHB-Einheit und F338 stattfinden können.

5. Diskussion

5.1. *PcIDS1* aus *Phaedon cochleariae*

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, wie *PcIDS1* durch metallabhängige Dimersymmetrie und allosterische Rückkopplung seine katalytische Aktivität präzise auf den Lebenszyklus von *P. cochleariae* abstimmen kann. Die regulatorischen Domänen haben sich dabei aus der hochkonservierten IDS-Topologie entwickelt, um die Produktverteilung durch exogene Metall-Cofaktoren von FPP zu GPP zu verschieben. Im Vergleich zur konstant hohen intrazellulären Konzentration von Mg^{2+} , sind Mn^{2+} und Co^{2+} im Fettkörpergewebe der Larven nur im Verhältnis 1:300, bzw. 1:20,000 zu finden.² SMI kompensieren diese niedrigen Konzentrationen durch ihre starke Lewis-Azidität und bilden stabilere Substratkomplexe mit *PcIDS1* aus als Mg^{2+} .^{118,119} Hierdurch würden SMI aber die Bildung von GPP und FPP in gleichem Maße beschleunigen und sind deshalb auf weitere Mechanismen angewiesen, um die Produktverteilung zu beeinflussen.^{121–123}

Symmetrie spielt bei fast allen scIDS eine wichtige Rolle, da sie die Dimer-Kontaktfläche zur Ausbildung selektiver Bindetaschen für ihre allylischen Substrate nutzen. Es wurden zwar heterodimere GPPS mit einem einzelnen aktiven Zentrum identifiziert,²⁰ *PcIDS1* tritt aber stets als Homodimer auf. Während der GPP-Synthese fördert $DMAPP_{AI}$ zusätzlich die Kooperativität zwischen den Untereinheiten durch Kontakte zwischen den Substratloops und löst die Vororientierung der IPP_{HAI} -Bindestelle aus. Verglichen mit dem Apo-Enzym ist die thermische Stabilität von *PcIDS1:DMAPP* erhöht, jedoch weist IPP für sich einen noch stärkeren Effekt auf (Abb. 11). Wie die Kristallstruktur zeigt, bindet IPP kompetitiv an die AI-Stelle binden und formt zusammen mit IPP_{HAI} einen nicht-katalytischen, geschlossenen Komplex.^{2,13,14} Werden die katalytischen Metallzentren durch SMI besetzt, verstärkt sich die Kooperativität zwischen der AI- und HAI-Stelle durch die Abwesenheit des Mg^{2+}_D -Clusters. Möglicherweise wird hierdurch auch $DMAPP$ an die HAI-Stelle rekrutiert, was den deutlichen, metallabhängigen Anstieg der Schmelztemperatur mit diesem Substrat erklärt. SMI fördern somit die GPP-Bildung, indem sie durch die Selektion auf C_5 -Liganden am aktiven Zentrum die Affinität für $DMAPP_{AI}$ und IPP_{HAI} erhöhen und die Reaktion beschleunigen (Abb. 31a).²

Sobald sich GPP gebildet hat, kann es entweder dissoziieren, um in die Monoterpen-Biosynthese einzutreten, oder zur weiteren Elongation an die AI-Stelle vorrücken. Die Bindung von GPP_{AI} bricht dabei die Dimer-Symmetrie und beschränkt die FPP-Synthese auf eine aktive Untereinheit (Abb. 31b). Die Ursache dieser Asymmetrie liegt in der einzigartigen CLD-Sequenz S174-L175-x-x-M178, die sich deutlich von bisher charakterisierten Motiven unterscheidet (Abb. 5). Bislang ging man davon aus, dass Substratspezifität überwiegend durch aromatische Seitenketten an den Positionen -5 und -4 relativ zum FARM vermittelt und -1 von einer kompakten Seitenkette eingenommen wird.^{25,30,124–126} In *PcIDS1* stabilisiert S174 stattdessen die Dimer-Interaktion, während der hydrophobe Teilbereich von L175 die Prenyleinheit von GPP_{AI} in Richtung von M178 leitet. Die hierdurch ausgelöste Inversion der Methionin-Seitenkette agiert als regulatorisches Element, dass die Bindung von GPP_{AI} auf eine Untereinheit beschränkt. Auffallend ist, dass der Methioninrest an -1 in einer scIDS aus Stechmücken konserviert ist. Dieses Enzym besitzt eine ähnliche, metallabhängige Produktregulation wie *PcIDS1*.⁵⁰

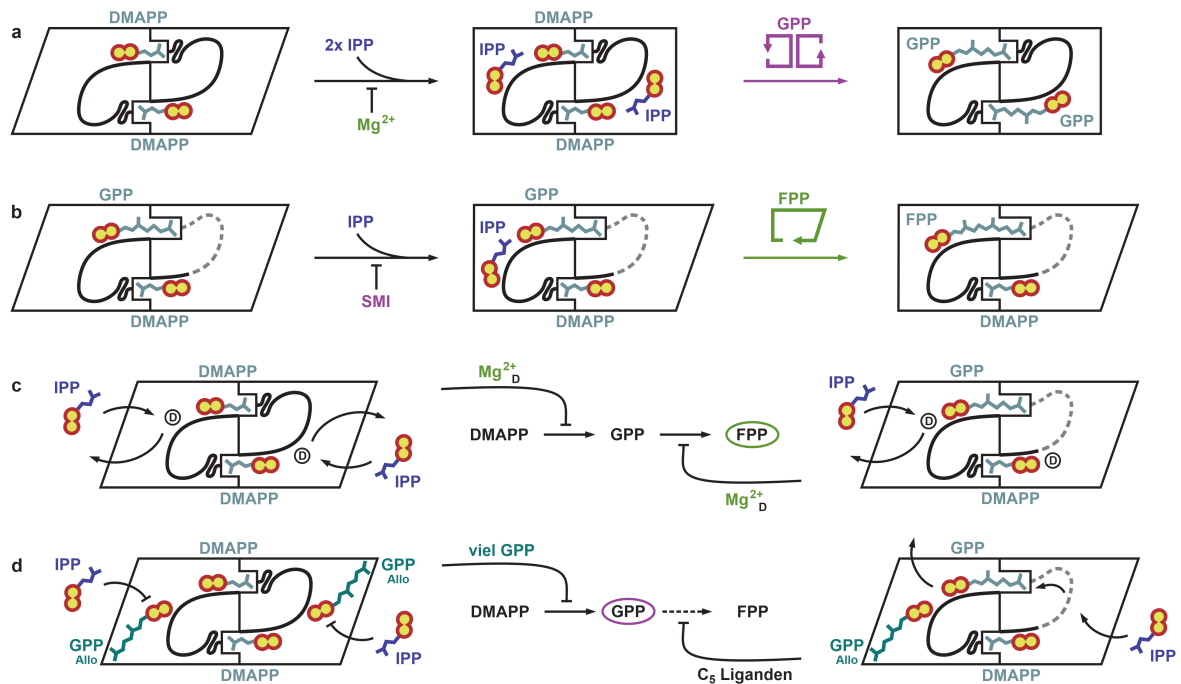


Abbildung 31. Regulation der Katalyse von *PcIDS1*. Die beiden Untereinheiten des Homodimers (SubA und SubB) sind im offenen (rautenförmig), bzw. geschlossenen Zustand (rechteckig) dargestellt. Die Substratloops werden als schwarze Linien gezeigt, unstrukturierte Bereiche sind grau gestrichelt. **a**, *PcIDS1* katalysiert die Reaktion von DMAPP und IPP zu GPP in beiden Untereinheiten gleichzeitig (symmetrisch, rosa Schema). SMI beschleunigen den Übergang in den geschlossenen Zustand mit IPP_{HAI} , während Mg^{2+} die Katalyse verlangsamt. **b**, Das Enzym kann GPP und IPP nur in einer Untereinheit zu FPP umwandeln (asymmetrisch, grünes Schema). SMI wirken der Koordination von GPP_{AI} entgegen, während Mg^{2+} den offenen Zustand stabilisiert. **c**, $\text{Mg}^{2+}_{\text{D}}$ wirkt der Bindung von IPP_{HAI} entgegen und hemmt die GPP- (links) und FPP-Synthese (rechts) gleichermaßen. **d**, Links: In Gegenwart von SMI kann GPP_{Allo} an beide Substratloops binden und GPP-Akkumulation verhindern. Rechts: GPP_{Allo} bindet an SubA und konkurriert mit der FPP-Synthese (gestrichelter Reaktionspfeil). C_5 -Liganden können durch Stabilisierung des Substratloops in SubB GPP_{AI} aus SubA verdrängen. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

GPP wird über starke hydrophobe Kontakte an die AI-Stelle gebunden. Diese sind unabhängig vom Metallcluster an PP_{AI} , was sich in einer vergleichbaren Stabilität der GPP-Komplexe mit Mg^{2+} , bzw. Mn^{2+} widerspiegelt (Abb. 11). Bei der Bildung von FPP in Gegenwart von Mg^{2+} verlangsamt die zusätzliche Metallstelle D die Reaktionsgeschwindigkeit,² aber der geordnete Substratloop rekrutiert IPP_{HAI} selektiv zur katalytischen Untereinheit (Abb. 31c). Hingegen benachteiligen SMI den asymmetrischen GPP_{AI} -Komplex, indem sie die Affinität aller AI- und HAI-Bindestellen für C_5 -Liganden erhöhen. Infolgedessen wirkt die Bindung von IPP_{HAI} an den fehlgeordneten Substratloop der GPP_{AI} -Koordination entgegen (Abb. 31d). Dennoch katalysiert *PcIDS1* die Synthese von FPP *in vitro* in Anwesenheit von SMI, allerdings mit einer 20-fach geringeren Affinität für GPP.² Diese Eigenschaft wird vermutlich durch die Substratinhibition von IPP_{AI} herabgesetzt, das wie DMAPP_{AI} stets den symmetrischen Zustand mit zwei geordneten Substratloops begünstigt. Unter physiologischen Umständen bleibt also die GPP-Synthese bevorzugt und wird selbst durch geringe SMI-Konzentrationen beschleunigt.

Um die Akkumulation von GPP in Gegenwart von SMI zu verhindern, scheint in *PcIDS1* die Feinabstimmung über eine allosterische Bindestelle zu erfolgen (Abb. 31d). Hierbei besetzt die C_{10} -Prenyleinheit von GPP_{Allo} einen hydrophoben Kanal am C-Terminus, während die PP_{Allo} mit IPP um die Bindung an die HAI-Stelle konkurriert. Dies verleiht GPP einen inhibitorischen

Charakter, der sowohl allosterischer, wie kompetitiver Natur ist und die Katalyse herabsetzt, indem es die Untereinheit in einem Übergangszustand festhält. Eine vergleichbare Regulation wurde bereits für die menschliche FPPS (*HsFPPS*) beschrieben, die einen C₁₅-spezifischen allosterischen Bindekanal aufweist, der Endprodukthemmung vermittelt und durch Inhibitoren spezifisch adressiert werden kann (Abb. 32).^{3,127} Trotz der strukturellen Gemeinsamkeiten weisen jedoch die Bindemodi der Prenyl-Liganden entscheidende Unterschiede auf. So steht FPP_{Allo} nicht in Kontakt mit dem Substratloop, an dem ein zusätzliches Phosphatation über R113 (R189 in *PcIDS1*) koordiniert wird (Abb. 32b). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die Bindung von FPP_{Allo} im Gegensatz zu GPP_{Allo} weitestgehend unabhängig vom allylischen Metallcluster ist.

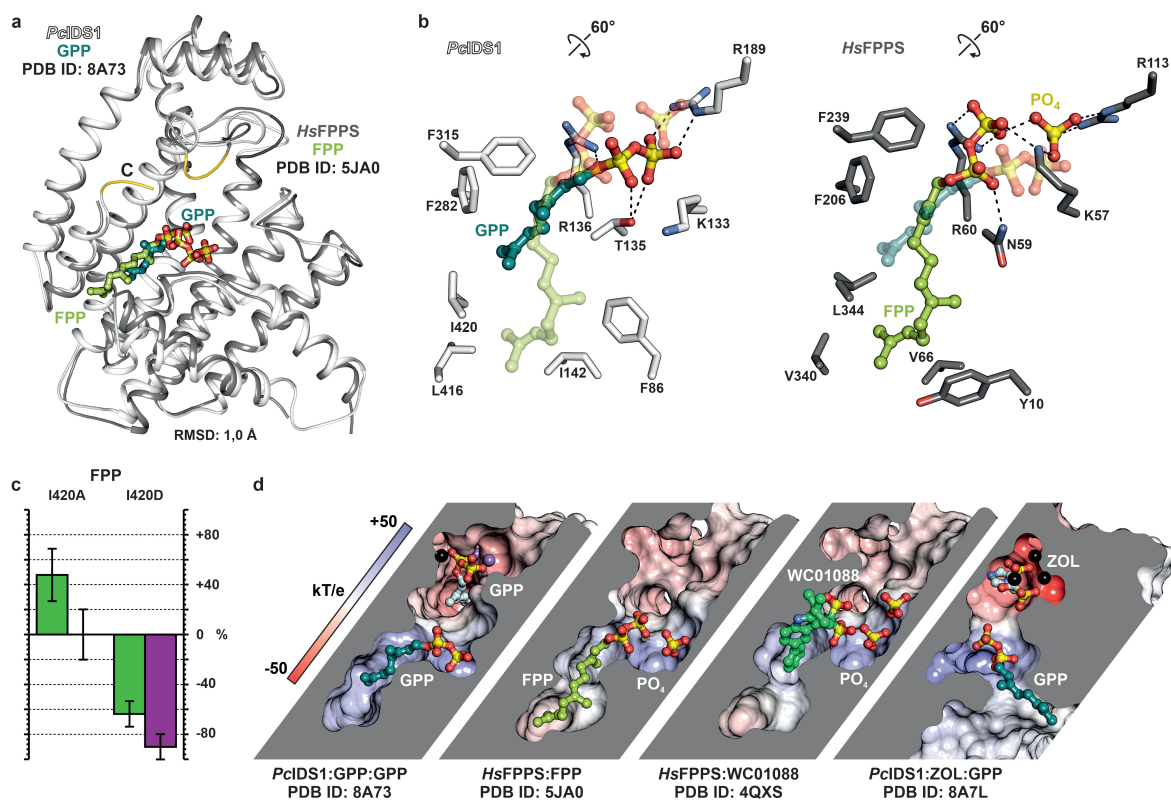


Abbildung 32. Allosterische Regulation von *PcIDS1*. GPP_{Allo} weist einen ähnlichen Bindemodus wie FPP_{Allo} in *HsFPPS* auf. **a**, Überlagerung von *PcIDS1*_{Mn}:GPP:GPP (weiß) und *HsFPPS*³ (grau): Die Struktur beider Enzyme ist hochkonserviert. Regionen, die sich in *PcIDS1* durch allosterische Bindung umordnen, sind gelb eingefärbt. **b**, Zoom auf die allosterische Bindetasche: GPP_{Allo} (links) interagiert mit dem Substratloop, während bei FPP_{Allo} (rechts) ein Phosphatation bindet. **c**, Relative Änderung der Schmelzpunktverschiebung (im Vergleich zu *PcIDS1*_{WT}) für Proteinmutanten von I420 in Gegenwart von FPP. **d**, Querschnitte der aktiven Zentren von *PcIDS1* und *HsFPPS* im Komplex mit allosterischen Regulatoren. Die elektrostatische Oberfläche (-50 bis 50 kT/e) deutet den sauren Charakter der Al-, sowie den basischen Charakter der HAL-Bindestellen an. Die Substanz WC01088 in *HsFPPS*¹²⁷ weist eine selektive Inhibition der Allo-Stelle auf. Gleichzeitig vermindern starke Inhibitoren wie ZOL_{Al} die Zugänglichkeit des allosterischen Kanals. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

Während in *PcIDS1* die Position 420 durch ein Isoleucin besetzt ist, das die Tasche für den C₁₀-Prenylrest nach unten begrenzt, gewährt die Orientierung von L344 in *HsFPPS* der Farnesyleinheit Zugang zu einem 4 Å tieferen Hohlraum. Wird diese aliphatische Position in *PcIDS1*_I420A durch Alanin ersetzt, binden in der Komplexstruktur weder GPP an die Allo- noch Mn²⁺ an die Al-Stelle (Abb. 25c). Gleichzeitig lässt sich jedoch ein deutlicher Effekt der

Mutation im TSA feststellen, da die thermische Stabilität bei FPP-Zugabe für *PcIDS1_I420A_{Mg}* zunimmt (Abb. 12). Dies unterstreicht die Annahme, dass der allosterische Bindekanal ein konserviertes Motiv dieser Enzymklasse ist, das seine Spezifität im Laufe der Evolution über einzelne Aminosäureseitenketten angepasst hat. Möglicherweise kann durch die Erweiterung des Kanals FPP_{Allo} transient binden, während ein nicht-konservativer Austausch wie in *PcIDS1_I420D* eine signifikante Destabilisierung des Komplexes auslöst (Abb. 32c).

Die vorliegende strukturelle und funktionelle Studie charakterisiert ein bislang einzigartiges Enzym, das zur Erfüllung seiner biologischen Funktion mehrere Regulationsmechanismen in Abhängigkeit der zur Verfügung stehenden Substrate und Cofaktoren integriert. Es ist anzunehmen, dass auch in anderen scIDS-Vertretern die Dimersymmetrie, die Art des katalytischen Metallions, sowie allosterische Regulation eine wichtige Rolle spielen. Ein grundlegendes Verständnis der Interaktionen zwischen Proteom und Substratom ist unerlässlich, um derart weit verbreitete und hochkonservierte Enzyme im medizinischen oder landwirtschaftlichen Kontext zu manipulieren.

5.2. MstE aus *Scytonema*

Die kristallographische Studie an MstE zeigt, dass dieses Enzym strukturell eng mit den SHC verwandt ist, einer Proteinklasse, die bereits seit Milliarden von Jahren existiert und als Ursprung der $\beta\gamma$ -Domänenarchitektur gilt.¹²⁸ Im Gegensatz zu allen bekannten TPS der Klasse II fehlt in MstE jedoch die γ -Domäne, die bislang als essenziell für die Substratbindung und stereoselektive Katalyse erachtet wurde. Wie MstE als Einzeldomänen-Enzym seine Funktion erfüllt, zeigt ein Vergleich mit *HsOSC*:Lanosterin (Abb. 33), dem bislang einzig bekannten Komplex einer Triterpensynthese mit seinem Produkt.⁸⁵

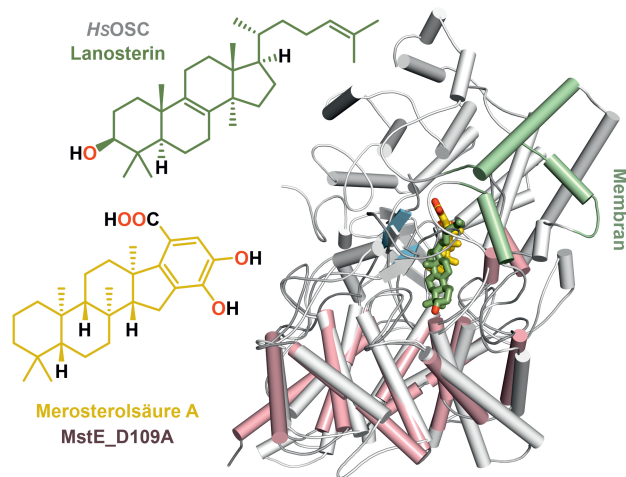


Abbildung 33. Eine Überlagerung zwischen MstE und *HsOSC* veranschaulicht die Bindemodi der Liganden. Teile der γ -Domäne verankern *HsOSC* (weiß) in der Membran (grün); das Produkt Lanosterin ist fest von den beiden α_6 - α_6 -Fässern umschlossen. MstE (pink) besitzt strukturelle Ähnlichkeit zur β -Domäne, bindet sein Produkt Merosterolsäure A aber über einzigartige Loop-Strukturen. Darstellung in Anlehnung an Moosmann et al.⁸²

Trotz des individuellen Aufbaus der Substratkanäle, werden die polyzyklischen Produkte im jeweiligen Enzym in ähnlicher Konformation zurückgehalten. Im Falle von *HsOSC* erfolgt die anschließende Freisetzung durch die membranassoziierte γ -Domäne,⁶³ während MA durch

seine DHB-Kopfgruppe vermutlich eine ausreichend hohe Löslichkeit besitzt, um das Enzym selbstständig zu verlassen. Die Überlagerung zwischen MstE und *HsOSC* zeigt deutlich, dass die β -Domänen selbst bei niedriger Sequenzidentität strukturell konserviert sind. Die γ -Domäne von *HsOSC* unterscheidet sich hingegen stark von der MstE-Kopfdomäne und stellt eine Insertion aus 12 Helices zwischen αH_1 und αH_2 der β -Region dar. Im Sequenzalignement beider Proteine fällt auf, dass Abschnitte von αH_{1-2} , S_{1-2} , sowie αH_2 von MstE wiederum in der Sequenz der γ -Domäne von *HsOSC* konserviert sind (Abb. A2). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass die $\beta\gamma$ -Architektur ein evolutionärer Abkömmling cytosolischer TPSII wie MstE ist (Abb. 8), die durch Duplikation, Insertionen und Mutationen im Laufe der Zeit hochgradig verändert wurden. Alternativ ist auch die Deletion der γ -Domäne eines gemeinsamen Vorläuferenzym denkbar, wodurch das Substratspektrum der Terpencyclasen auf lösliche Meroterpenoide erweitert werden konnte.

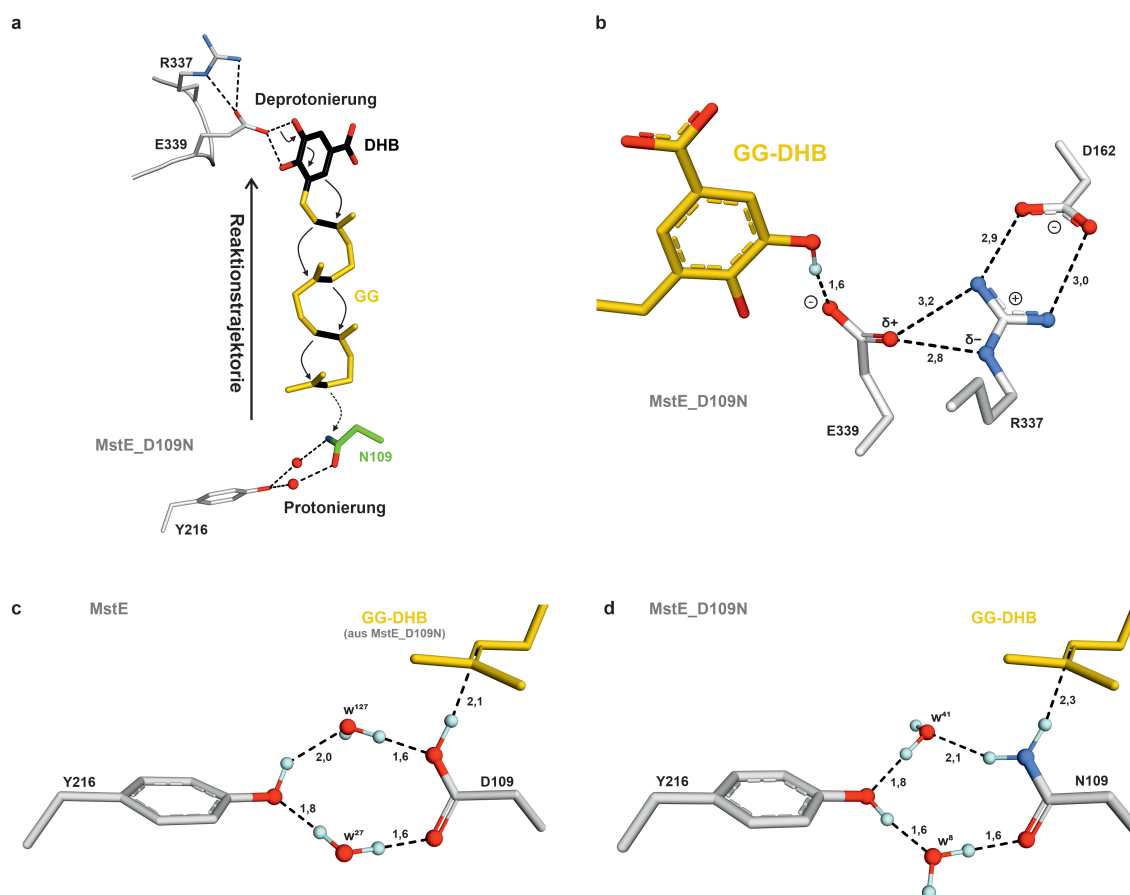


Abbildung 34. Katalyse in MstE. **a**, GG-DHB wird durch polare und aromatische Wechselwirkungen im Substratkanal verankert. D109 (N109 in der Struktur) protoniert die terminale Doppelbindung und löst die Reaktionskaskade aus, die bis zur DHB-Kopfgruppe fortschreitet. **b**, E339 wird durch R337 und D162 aktiviert und deprotoniert die *meta*-Hydroxylgruppe. **c**, Das Proton-Relais um die Brønsted-Säure D109 bringt das katalytische *anti*-Proton in unmittelbare Nähe der GG-DHB-Doppelbindung (modelliert aus MstE_D109N). **d**, Das Carbonsäureamid von N109 bewirkt eine Umordnung des Proton-Netzwerks und verhindert so die enzymatische Aktivität. Darstellung in Anlehnung an Moosmann et al.⁸²

Zusätzlich zu seinem individuellen Aufbau, bedient sich MstE einer außergewöhnlichen Aktivierungsstrategie um insgesamt vier neue C-C-Bindungen zielgerichtet und stereoselektiv in sein Produkt einzuführen. Der Vergleich zwischen der Koordinierung von Fs-DHB und GG-DHB zeigt, dass hierfür die Länge des Prenylrests eine wesentliche Rolle spielt, während die DHB-Einheit durch die Interaktion mit Y157 einen starren Selektionsanker darstellt (Abb. 28a und b). Die polare Kopfgruppe des Substrats macht die Reaktion in MstE überhaupt erst

möglich, da die Reaktionskammer hier nicht zwischen einer β - und γ -Domäne von der Umgebung abgeschlossen ist (Abb. 34a). Während SHC und OSC das letzte Carbokation-Intermediat der Reaktion durch Deprotonierung, Wasseraddition oder Umlagerungen selektiv in das Endprodukt überführen können (Abb. 7), wäre ein vergleichbarer Zwischenzustand in MstE möglicherweise unspezifischen Nebenreaktionen ausgeliefert. Aus diesem Grund bildet E339 in MstE nicht nur Wasserstoffbrücken mit den beiden Alkoholfunktionen des Substrats, sondern polarisiert über ein Netzwerk R337 und D162, um die *meta*-Hydroxygruppe selektiv zu deprotonieren (Abb. 34b). Dies ermöglicht einen starken π -Elektronenschub in das aromatische System und erleichtert die Bildung des sterisch ungünstigen Cyclopentanrings. Übereinstimmend damit ist keinerlei katalytische Aktivität mit einem Surrogat ohne *meta*-Hydroxyleinheit zu beobachten.⁴

Am Boden des Substratkanals, inmitten des α_6 - α_6 -Fasses, befindet sich das konservierte D109 in unmittelbarer Nähe der terminalen Doppelbindung der Prenylkette. Um als Brønsted-Säure zu agieren, wird es über ein Proton-Relais mit Y216 aktiviert. Abbildung 34c zeigt auf, wie die Wassermoleküle ausgerichtet sein könnten. Die Positionierung des Carbonsäure-Protons in *anti* erlaubt dabei eine signifikant höhere Azidität, sowie stärkere Wechselwirkungen mit den angrenzenden Wassermolekülen.¹²⁹ Gleichzeitig kann das Proton unmittelbar nach dem nukleophilen Angriff der Doppelbindung ersetzt werden. Vermutlich erfolgt die Regenerierung des Proton-Relais durch Wassermoleküle aus der Umgebung, die über polare Kanäle in die helikale Basis eintreten können.⁸⁵ Die initiale Protonierung löst alle aufeinanderfolgenden Ringbildungen aus, wobei die kurzlebigen tertiären Carbokation-Intermediate durch die aromatische Auskleidung des Bindekanals stabilisiert werden. Bemerkenswerterweise lässt sich ein trizyklisches Nebenprodukt (MB) nachweisen, wenn der Gatekeeper-Rest Y157 modifiziert wird (Abb. 29d). Analog zu OSC und SHC scheinen die ersten drei Zyklisierungen also nahezu konzertiert zu verlaufen, während die vierte auf die Deprotonierung der *meta*-Hydroxylgruppe angewiesen ist.¹³⁰ Eine Beeinträchtigung der DHB-Koordination kann also zur Folge haben, dass das aromatische System das Carbokation an Ring C verzögert angreift und Nebenreaktionen ermöglicht.⁸²

Zur Bildung von MA wird nach dem vierten Ringschluss die Aromatizität des Produkts durch enzymunabhängige Keto-Enol-Tautomerie wieder hergestellt. MstE_D109A:MA zeigt, dass das Produkt an MstE assoziiert bleibt, durch seine starke Krümmung und fehlende Interaktion mit Y157 aber eine deutlich geringere Affinität als GG-DHB aufweist. Es ist anzunehmen, dass MstE_D109A noch eine geringe Restaktivität besitzt, sodass sich Kristalle der Produktstruktur bildeten. Ebenso ist ein MPD-Molekül zu beobachten, das passgenau in die chemische Umgebung des Kanalbodens bindet. Diese Chemikalie wird routinemäßig in Kristallisationsexperimenten als Präzipitanz eingesetzt und ist somit in allen Ansätzen in nanomolaren Konzentrationen vorhanden. Da MPD nur in Abwesenheit der Carboxylgruppe von D109 binden kann und eine hydrophobe Interaktionsfläche für MA bietet, könnte MstE_D109A im Laufe der Kristallisation (Tage bis Wochen) die Produktstruktur aufbauen. Analog bindet MstE_D109N selektiv GG-DHB, da das Enzym die WT-Konfiguration des Proton-Relais' bestens mimiert und mit der Doppelbindung interagiert (Abb. 34d). Die Kristallstruktur lässt zudem erkennen, dass das zweite Proton der Amidgruppe das nächstgelegene Wassermolekül in Richtung Y216 schiebt und so die Protonierungskaskade invertiert. Damit blockiert N109 die Reaktion stärker als dies in der D109A-Variante der Fall ist, bei der eine Protonierung durch H_3O^+ -Ionen denkbar wäre. Unterstützt wird diese Vermutung auch durch Ergebnisse des Aktivitätstests, in denen der Produktpeak für D109A stärker ausgeprägt ist als für D109N (Abb. 30a).

Zusammenfassend zeichnen die erhaltenen Ergebnisse ein umfassendes Bild des in seiner Architektur und Funktion bislang einzigartigen Enzyms MstE. Es zeigen sich Gemeinsamkeiten in Sequenz und Struktur zu bekannten Terpencyclasen, jedoch eröffnet das lösliche, proteinchemisch zugängliche und *in vitro* aktive Enzym neue Perspektiven zur chemoenzymatischen Naturstoffsynthese von Terpenen. Auf Grundlage der beschriebenen Kristallstrukturen gelang der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Jörn Piel (ETH Zürich) bereits der Nachweis eines alternativen Produkts, das Fasciochinolen, einer Gruppe natürlich vorkommender Antibiotika, ähnelt.^{82,131} Die beobachtete Entkopplung der ersten drei Zyklisierungsschritte vom nukleophilen Angriff der aromatischen Kopfgruppe könnte eine ausschlaggebende Rolle für das künftige Design modifizierter Meroterpenderivate spielen.

6. Literaturverzeichnis

1. Summons, R. E., Bradley, A. S., Jahnke, L. L., Waldbauer, J. R. Steroids, triterpenoids and molecular oxygen. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 361, 951–968, **2006**.
2. Frick, S. *et al.* Metal ions control product specificity of isoprenyl diphosphate synthases in the insect terpenoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 4194–4199, **2013**.
3. Park, J., Zielinski, M., Magder, A., Tsantrizos, Y. S., Berghuis, A. M. Human farnesyl pyrophosphate synthase is allosterically inhibited by its own product. *Nat. Commun.* 8, 14132, **2017**.
4. Moosmann, P. *et al.* Cyanobacterial ent-Sterol-Like Natural Products from a Deviated Ubiquinone Pathway. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 56, 4987–4990, **2017**.
5. CRC Press, Taylor & Francis Group Dictionary of Natural Products. (online verfügbar unter <http://dnp.chemnetbase.com>).
6. Hillier, S. G., Lathe, R. Terpenes, hormones and life: isoprene rule revisited. *J. Endocrinol.* 242, R9-R22, **2019**.
7. Del Prado-Audelo, M. L. *et al.* Therapeutic Applications of Terpenes on Inflammatory Diseases. *Front. Pharmacol.* 12, 704197, **2021**.
8. Kumar Dash, D., Kishore Tyagi, C., Kumar Sahu, A., Tripathi, V. Revisiting the Medicinal Value of Terpenes and Terpenoids. *Revisiting Plant Biostimulants*, 10.5772/intechopen.102612.
9. Gerwick, W. H., Moore, B. S. Lessons from the past and charting the future of marine natural products drug discovery and chemical biology. *Chem. Biol.* 19, 85–98, **2012**.
10. Ninkuu, V. *et al.* Biochemistry of Terpenes and Recent Advances in Plant Protection. *Int. J. Mol. Sci.* 22, **2021**.
11. Kuzuyama, T. Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66, 1619–1627, **2002**.
12. Jomaa, H. *et al.* Inhibitors of the nonmevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis as antimalarial drugs. *Science.* 285, 1573–1576, **1999**.
13. Reed, B. C., Rilling, H. C. Substrate Binding of avian liver prenyltransferase. *Biochemistry.* 15, 3739–3745, **1976**.
14. Barnard, G. F., Popják, G. Human liver prenyltransferase and its characterization. *Biochim. Biophys. Acta.* 661, 87–99, **1981**.
15. Ecker, F., Vattekkatte, A., Boland, W., Groll, M. Metal-dependent enzyme symmetry guides the biosynthetic flux of terpene precursor catalysis, **2022**. (siehe Anmerkung zur Veröffentlichung der Dissertation, Seite 80)
16. Cornforth, J. W., Cornforth, R. H., Donninger, C., Popják, G. Studies on the biosynthesis of cholesterol XIX. Steric course of hydrogen eliminations and of C-C bond formations in squalene biosynthesis. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 163, 492–514, **1966**.
17. Wang, K. Isoprenyl diphosphate synthases. *Biochim. Biophys. Acta.* 1529, 33–48, **2000**.
18. Ogura, K., Koyama, T. Enzymatic Aspects of Isoprenoid Chain Elongation. *Chem. Rev.* 98, 1263–1276, **1998**.
19. Burke, C. C., Wildung, M. R., Croteau, R. Geranyl diphosphate synthase: cloning, expression, and characterization of this prenyltransferase as a heterodimer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 13062–13067, **1999**.
20. Chang, T.-H. *et al.* Structure of a heterotetrameric geranyl pyrophosphate synthase from mint (*Mentha piperita*) reveals intersubunit regulation. *Plant Cell.* 22, 454–467, **2010**.
21. Sasaki, D. *et al.* Crystal structure of heterodimeric hexaprenyl diphosphate synthase from *Micrococcus luteus* B-P 26 reveals that the small subunit is directly involved in the product chain length regulation. *J. Biol. Chem.* 286, 3729–3740, **2011**.
22. Koyama, T., Gotoh, Y., Nishino, T. Intersubunit location of the active site of farnesyl diphosphate synthase: reconstruction of active enzymes by hybrid-type heteromeric dimers of site-directed mutants. *Biochemistry.* 39, 463–469, **2000**.
23. Mirdita, M. *et al.* ColabFold: making protein folding accessible to all. *Nat. Methods.* 19, 679–682, **2022**.
24. Gilg, A. B., Bearfield, J. C., Tittiger, C., Welch, W. H., Blomquist, G. J. Isolation and functional expression of an animal geranyl diphosphate synthase and its role in bark beetle pheromone biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 9760–9765, **2005**.

25. Tarshis, L. C., Proteau, P. J., Kellogg, B. A., Sacchettini, J. C., Poulter, C. D. Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 15018–15023, **1996**.
26. Sun, H.-Y. *et al.* Homodimeric hexaprenyl pyrophosphate synthase from the thermoacidophilic crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* displays asymmetric subunit structures. *J. Bacteriol.* 187, 8137–8148, **2005**.
27. Guo, R.-T. *et al.* Bisphosphonates target multiple sites in both cis- and trans-prenyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 10022–10027, **2007**.
28. Wang, C. *et al.* Structural Analyses of Short-Chain Prenyltransferases Identify an Evolutionarily Conserved GFPPS Clade in Brassicaceae Plants. *Mol. Plant.* 9, 195–204, **2016**.
29. Zhou, F. *et al.* A recruiting protein of geranylgeranyl diphosphate synthase controls metabolic flux toward chlorophyll biosynthesis in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 114, 6866–6871, **2017**.
30. Vandermoten, S., Haubruge, E., Cusson, M. New insights into short-chain prenyltransferases: structural features, evolutionary history and potential for selective inhibition. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 3685–3695, **2009**.
31. Ohnuma, S. i., Hirooka, K., Ohto, C., Nishino, T. Conversion from archaeal geranylgeranyl diphosphate synthase to farnesyl diphosphate synthase. Two amino acids before the first aspartate-rich motif solely determine eukaryotic farnesyl diphosphate synthase activity. *J. Biol. Chem.* 272, 5192–5198, **1997**.
32. Liang, P.-H., Ko, T.-P., Wang, A. H.-J. Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur. J. Biochem.* 269, 3339–3354, **2002**.
33. Bellés, X., Martín, D., Piulachs, M.-D. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 181–199, **2005**.
34. Clark, A. J., Block, K. The absence of sterol synthesis in insects. *J. Biol. Chem.* 234, 2578–2582, **1959**.
35. W. G. Goodman, N. A. Granger, in *Comprehensive Molecular Insect Science* (Elsevier, 2005), pp. 319–408.
36. Konopova, B., Jindra, M. Juvenile hormone resistance gene Methoprene-tolerant controls entry into metamorphosis in the beetle *Tribolium castaneum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 10488–10493, **2007**.
37. Kislow, C. J., Edwards, L. J. Repellent Odour in Aphids. *Nature.* 235, 108–109, **1972**.
38. Cusson, M. *et al.* Biosynthesis and release of juvenile hormone and its precursors in insects and crustaceans: The search for a unifying arthropod endocrinology. *Insect Biochem.* 21, 1–6, **1991**.
39. Weibel, D. B. *et al.* Iridoid biosynthesis in staphylinid rove beetles (Coleoptera: Staphylinidae, Philonthinae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 583–591, **2001**.
40. Gauss, R. Der Meerrettichblattkäfer *Phaedon cochleariae* Fabr. als Kiefernknospen-Vernichter. *Z. Angew. Entomol.* 58, 186–188, **1966**.
41. Pasteels, J. M., Braekman, J. C., Daloze, D., Ottinger, R. Chemical defence in chrysomelid larvae and adults. *Tetrahedron.* 38, 1891–1897, **1982**.
42. Fu, N. *et al.* A cytochrome P450 from the mustard leaf beetles hydroxylates geraniol, a key step in iridoid biosynthesis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 113, 103212, **2019**.
43. Burse, A. *et al.* Iridoid biosynthesis in Chrysomelina larvae: Fat body produces early terpenoid precursors. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 255–265, **2007**.
44. Burse, A. *et al.* Implication of HMGR in homeostasis of sequestered and de novo produced precursors of the iridoid biosynthesis in leaf beetle larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 76–88, **2008**.
45. Lorenz, M., Boland, W., Dettner, K. Biosynthesis of Iridodials in the Defense Glands of Beetle Larvae (Chrysomelinae). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32, 912–914, **1993**.
46. Lewis, M. J., Prosser, I. M., Mohib, A., Field, L. M. Cloning and characterisation of a prenyltransferase from the aphid *Myzus persicae* with potential involvement in alarm pheromone biosynthesis. *Insect Mol. Biol.* 17, 437–443, **2008**.
47. Vandermoten, S. *et al.* Characterization of a novel aphid prenyltransferase displaying dual geranyl/farnesyl diphosphate synthase activity. *FEBS Lett.* 582, 1928–1934, **2008**.
48. Vandermoten, S. *et al.* Structural features conferring dual geranyl/farnesyl diphosphate synthase activity to an aphid prenyltransferase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 707–716, **2009**.
49. Ma, G.-Y., Sun, X.-F., Zhang, Y.-L., Li, Z.-X., Shen, Z.-R. Molecular cloning and characterization of a prenyltransferase from the cotton aphid, *Aphis gossypii*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 552–561, **2010**.
50. Rivera-Perez, C., Nyati, P., Noriega, F. G. A corpora allata farnesyl diphosphate synthase in mosquitoes displaying a metal ion dependent substrate specificity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 64, 44–50, **2015**.
51. Conklin, D. S., McMaster, J. A., Culbertson, M. R., Kung, C. COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3678–3688, **1992**.

52. Sen, S. E., Brown, D. C., Sperry, A. E., Hitchcock, J. R. Prenyltransferase of larval and adult *M. sexta* corpora allata. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 29–40, **2007**.
53. Ables, E. T., Drummond-Barbosa, D. Steroid Hormones and the Physiological Regulation of Tissue-Resident Stem Cells: Lessons from the *Drosophila* Ovary. *Curr. Stem Cell Rep.* 3, 9–18, **2017**.
54. Karlson, P., Hoffmeister, H., Hoppe, W., Huber, R. Zur Chemie Des Ecdysons. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 662, 1–20, **1963**.
55. Gilbert, L. I. Halloween genes encode P450 enzymes that mediate steroid hormone biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Endocrinol.* 215, 1–10, **2004**.
56. Sezgin, E., Levental, I., Mayor, S., Eggeling, C. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 361–374, **2017**.
57. Wei, J. H., Yin, X., Welander, P. V. Sterol Synthesis in Diverse Bacteria. *Front. Microbiol.* 7, 990, **2016**.
58. Nakashima, T. *et al.* Cloning, expression, and characterization of cDNAs encoding *Arabidopsis thaliana* squalene synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 2328–2332, **1995**.
59. Morikubo, N. *et al.* Cation- π interaction in the polyolefin cyclization cascade uncovered by incorporating unnatural amino acids into the catalytic sites of squalene cyclase. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 13184–13194, **2006**.
60. Reinert, D. J., Balliano, G., Schulz, G. E. Conversion of squalene to the pentacarbocyclic hopene. *Chem. Biol.* 11, 121–126, **2004**.
61. Wendt, K. U., Schulz, G. E., Corey, E. J., Liu, D. R. Enzyme Mechanisms for Polycyclic Triterpene Formation. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39, 2812–2833, **2000**.
62. Hess, B. A., Smentek, L. Concerted nature of AB ring formation in the enzymatic cyclization of squalene to hopenes. *Org. Lett.* 6, 1717–1720, **2004**.
63. Wendt, K. U. Enzyme mechanisms for triterpene cyclization: new pieces of the puzzle. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 44, 3966–3971, **2005**.
64. Fischer, W. W., Pearson, A. Hypotheses for the origin and early evolution of triterpenoid cyclases. *Geobiol.* 5, 19–34, **2007**.
65. Gold, D. A., Caron, A., Fournier, G. P., Summons, R. E. Paleoproterozoic sterol biosynthesis and the rise of oxygen. *Nature.* 543, 420–423, **2017**.
66. Santana-Molina, C., Rivas-Marin, E., Rojas, A. M., Devos, D. P. Origin and Evolution of Polycyclic Triterpene Synthesis. *Mol. Biol. Evol.* 37, 1925–1941, **2020**.
67. Abe, I., Rohmer, M., Prestwich, G. D. Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chem. Rev.* 93, 2189–2206, **1993**.
68. Dickschat, J. S. Isoprenoids in three-dimensional space: the stereochemistry of terpene biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 28, 1917–1936, **2011**.
69. Baer, P. *et al.* Induced-fit mechanism in class I terpene cyclases. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 53, 7652–7656, **2014**.
70. Christianson, D. W. Structural and Chemical Biology of Terpenoid Cyclases. *Chem. Rev.* 117, 11570–11648, **2017**.
71. Wendt, K. U., Schulz, G. E. Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes. *Structure.* 6, 127–133, **1998**.
72. Lesburg, C. A., Zhai, G., Cane, D. E., Christianson, D. W. Crystal structure of pentalenene synthase: mechanistic insights on terpenoid cyclization reactions in biology. *Science.* 277, 1820–1824, **1997**.
73. Gatto, N. *et al.* Isotope sensitive branching and kinetic isotope effects to analyse multiproduct terpenoid synthases from *Zea mays*. *Chem. Commun.* 51, 3797–3800, **2015**.
74. Steele, C. L., Crock, J., Bohlmann, J., Croteau, R. Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). Comparison of constitutive and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of delta-selinene synthase and gamma-humulene synthase. *J. Biol. Chem.* 273, 2078–2089, **1998**.
75. Rynkiewicz, M. J., Cane, D. E., Christianson, D. W. Structure of trichodiene synthase from *Fusarium sporotrichioides* provides mechanistic inferences on the terpene cyclization cascade. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 13543–13548, **2001**.
76. Köksal, M., Chou, W. K. W., Cane, D. E., Christianson, D. W. Structure of 2-methylisoborneol synthase from *Streptomyces coelicolor* and implications for the cyclization of a noncanonical C-methylated monoterpenoid substrate. *Biochemistry.* 51, 3011–3020, **2012**.

77. Janke, R., Görner, C., Hirte, M., Brück, T., Loll, B. The first structure of a bacterial diterpene cyclase: CotB2. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 70, 1528–1537, **2014**.
78. Wendt, K. U., Lenhart, A., Schulz, G. E. The structure of the membrane protein squalene-hopene cyclase at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 286, 175–187, **1999**.
79. Hyatt, D. C. *et al.* Structure of limonene synthase, a simple model for terpenoid cyclase catalysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 5360–5365, **2007**.
80. Köksal, M., Jin, Y., Coates, R. M., Croteau, R., Christianson, D. W. Taxadiene synthase structure and evolution of modular architecture in terpene biosynthesis. *Nature.* 469, 116–120, **2011**.
81. Köksal, M., Christianson, D. W. Crystal structure of ent-copalyl diphosphate synthase from *Arabidopsis thaliana* in complex with 13-aza-13,14-dihydrocopalyl diphosphate (2011). (online verfügbar unter 10.2210/pdb3pyb/pdb).
82. Moosmann, P. *et al.* A monodomain class II terpene cyclase assembles complex isoprenoid scaffolds. *Nat. Chem.* 12, 968–972, **2020**.
83. Gao, Y., Honzatko, R. B., Peters, R. J. Terpenoid synthase structures: a so far incomplete view of complex catalysis. *Nat. Prod. Rep.* 29, 1153–1175, **2012**.
84. Wendt, K. U., Poralla, K., Schulz, G. E. Structure and function of a squalene cyclase. *Science.* 277, 1811–1815, **1997**.
85. Thoma, R. *et al.* Insight into steroid scaffold formation from the structure of human oxidosqualene cyclase. *Nature.* 432, 118–122, **2004**.
86. Cao, R. *et al.* Diterpene cyclases and the nature of the isoprene fold. *Proteins.* 78, 2417–2432, **2010**.
87. Rudolf, J. D. *et al.* Structure of the ent-Copalyl Diphosphate Synthase PtmT2 from *Streptomyces platensis* CB00739, a Bacterial Type II Diterpene Synthase. *J. Am. Chem. Soc.* 138, 10905–10915, **2016**.
88. Zhou, K. *et al.* Insights into diterpene cyclization from structure of bifunctional abietadiene synthase from *Abies grandis*. *J. Biol. Chem.* 287, 6840–6850, **2012**.
89. Oldfield, E., Lin, F.-Y. Terpene biosynthesis: modularity rules. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 51, 1124–1137, **2012**.
90. Starks, C. M., Back, K., Chappell, J., Noel, J. P. Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase. *Science.* 277, 1815–1820, **1997**.
91. Whittington, D. A. *et al.* Bornyl diphosphate synthase: structure and strategy for carbocation manipulation by a terpenoid cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 15375–15380, **2002**.
92. Piel, J. Metabolites from symbiotic bacteria. *Nat. Prod. Rep.* 26, 338–362, **2009**.
93. Menna, M., Imperatore, C., D'Aniello, F., Aiello, A. Meroterpenes from marine invertebrates: structures, occurrence, and ecological implications. *Mar. Drugs.* 11, 1602–1643, **2013**.
94. Grote, A. *et al.* JCat: a novel tool to adapt codon usage of a target gene to its potential expression host. *Nucleic. Acids Res.* 33, W526-31, **2005**.
95. Vattekkatte, A., Gatto, N., Schulze, E., Brandt, W., Boland, W. Inhibition of a multiproduct terpene synthase from *Medicago truncatula* by 3-bromoprenyl diphosphates. *Org. Biomol. Chem.* 13, 4776–4784, **2015**.
96. Davis, M. W., Jorgensen, E. M. ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. *Front. Bioinform.* 2, **2022**.
97. J. M. Walker The proteomics protocols handbook (Humana Press, Totowa, N.J., **2005**).
98. Kabsch, W. XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 125–132, **2010**.
99. Winn, M. D. *et al.* Overview of the CCP4 suite and current developments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 235–242, **2011**.
100. Burley, S. K. *et al.* RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic. Acids Res.* 49, D437-D451, **2021**.
101. McCoy, A. J. *et al.* Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* 40, 658–674, **2007**.
102. Murshudov, G. N. *et al.* REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 67, 355–367, **2011**.
103. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., Cowtan, K. Features and development of Coot. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 66, 486–501, **2010**.
104. Langer, G., Cohen, S. X., Lamzin, V. S., Perrakis, A. Automated macromolecular model building for X-ray crystallography using ARP/wARP version 7. *Nat. Protoc.* 3, 1171–1179, **2008**.
105. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., Thornton, J. M. PROCHECK. *J. Appl. Crystallogr.* 26, 283–291, **1993**.

106. Read, R. J., Schierbeek, A. J. A phased translation function. *J. Appl. Crystallogr.* 21, 490–495, **1988**.
107. Kraulis, P. J. MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* 24, 946–950, **1991**.
108. W. L. Delano The PyMOL Molecular Graphics System (Schrödinger, LLC., **2002**).
109. Notredame, C., Higgins, D. G., Heringa, J. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* 302, 205–217, **2000**.
110. Krissinel, E., Henrick, K. Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* 372, 774–797, **2007**.
111. Holm, L. Using Dali for Protein Structure Comparison. *Methods Mol. Biol.* 2112, 29–42, **2020**.
112. Mullis, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263–273, **1986**.
113. Dower, W. J., Miller, J. F., Ragsdale, C. W. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic. Acids Res.* 16, 6127–6145, **1988**.
114. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227, 680–685, **1970**.
115. Heijne, G. von, Steppuhn, J., Herrmann, R. G. Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* 180, 535–545, **1989**.
116. Butt, T. R., Edavettal, S. C., Hall, J. P., Mattern, M. R. SUMO fusion technology for difficult-to-express proteins. *Protein Expr. Purif.* 43, 1–9, **2005**.
117. Mao, J. *et al.* Solid-state NMR, crystallographic, and computational investigation of bisphosphonates and farnesyl diphosphate synthase-bisphosphonate complexes. *J. Am. Chem. Soc.* 128, 14485–14497, **2006**.
118. Trachtman, M., Markham, G. D., Glusker, J. P., George, P., Bock, C. W. Interactions of Metal Ions with Water: Ab Initio Molecular Orbital Studies of Structure, Bonding Enthalpies, Vibrational Frequencies and Charge Distributions. 1. Monohydrates. *Inorg. Chem.* 37, 4421–4431, **1998**.
119. Bock, C. W., Katz, A. K., Markham, G. D., Glusker, J. P. Manganese as a Replacement for Magnesium and Zinc: Functional Comparison of the Divalent Ions. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 7360–7372, **1999**.
120. Poralla, K. *et al.* A specific amino acid repeat in squalene and oxidosqualene cyclases. *Trends Biochem. Sci.* 19, 157–158, **1994**.
121. Sissi, C., Palumbo, M. Effects of magnesium and related divalent metal ions in topoisomerase structure and function. *Nucleic. Acids Res.* 37, 702–711, **2009**.
122. Dismukes, G. C. Manganese Enzymes with Binuclear Active Sites. *Chem. Rev.* 96, 2909–2926, **1996**.
123. Irving, H., Williams, R. J. P. Order of Stability of Metal Complexes. *Nature.* 162, 746–747, **1948**.
124. Wang, K., Ohnuma, S. Chain-length determination mechanism of isoprenyl diphosphate synthases and implications for molecular evolution. *Trends Biochem. Sci.* 24, 445–451, **1999**.
125. Stanley Fernandez, S. M., Kellogg, B. A., Poulter, C. D. Farnesyl diphosphate synthase. Altering the catalytic site to select for geranyl diphosphate activity. *Biochemistry.* 39, 15316–15321, **2000**.
126. Narita, K., Ohnuma, S., Nishino, T. Protein design of geranyl diphosphate synthase. Structural features that define the product specificities of prenyltransferases. *J. Biochem.* 126, 566–571, **1999**.
127. Gritzalis, D. *et al.* Probing the molecular and structural elements of ligands binding to the active site versus an allosteric pocket of the human farnesyl pyrophosphate synthase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 25, 1117–1123, **2015**.
128. Brocks, J. J., Buick, R., Summons, R. E., Logan, G. A. A reconstruction of Archean biological diversity based on molecular fossils from the 2.78 to 2.45 billion-year-old Mount Bruce Supergroup, Hamersley Basin, Western Australia. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 67, 4321–4335, **2003**.
129. Sofronov, O. O., Giubertoni, G., Pérez de Alba Ortíz, A., Ensing, B., Bakker, H. J. Peptide Side-COOH Groups Have Two Distinct Conformations under Biorelevant Conditions. *J. Phys. Chem. Lett.* 11, 3466–3472, **2020**.
130. Smentek, L., Hess, B. A. Compelling computational evidence for the concerted cyclization of the ABC rings of hopene from protonated squalene. *J. Am. Chem. Soc.* 132, 17111–17117, **2010**.
131. Zhang, H., Khalil, Z. G., Capon, R. J. Fascioquinols A–F: bioactive meroterpenes from a deep-water southern Australian marine sponge, *Fasciospongia* sp. *Tetrahedron.* 67, 2591–2595, **2011**.
132. Hosfield, D. J. *et al.* Structural basis for bisphosphonate-mediated inhibition of isoprenoid biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 279, 8526–8529, **2004**.

7. Anhang

7.1. Proteinsequenzen

Die durch die Restriktionsschnittstellen eingeführten Aminosäurereste sind blau markiert.

PcIDS1

GSFSKEESREFMAIFPDIVRDLTDAGRHTDIPEVTKRFAKVLQYNVPTGKKTRGLSTVIAYK
MLEKPENLTPENVRLAGILGWCVELLQASLLIMDDLMDRSETRRGQPCWYRQENVGFLAIND
CLHVESLVSFLRKYFSHLPCYVPIIELFHDVNFKTNMGQSLDALCMKDGRPILSQFTMKRY
SSIVKYKTSYYTFQLPVSLGMYLADMYDPEQHRQAKTILMEIGEFFQIQDDFLDAFGDSQVT
GKVGTDIKEGKCSWLAVVALQRSNPAQRQIMEEHYGRPEPESTQIIKNLYIELGLPATFAVY
EEESFNIIRTHIHQISKGLPHDLFFKIMKKIYKRDA

MstE

GSTLQPLENSTRQEKLLYPKLNQLSNSINA AVAFLL EARNLEGWWQDFNFPQAASIGDEWVT
AYVGTMLATLPYAHVHEALMQAWELLKIRDHRPTGEWGYNYILCGDADTTGWALQLAAVGA
SDSERAQQARAALATHLQPNNGIATFAEESIRAYIKVPDLANVSFQGWCGAHTCVSAAVAAL
PEFRSRLHDYLRVTQTSQGNWEGYWSDHEYTTALTAEALAAGGQAADQPSIEQAVAWGLKR
LCPQGFVATSKHPNGSTFATAWCLRLLLLLNTVDAEVKAARAAAIGWLLEQQRPNGSWVSSAY
LRIPYPFDRNPNQFPHWRYYDEIEGDKRFEGSIIFDHNSIFTTATVVNSLVKAAPML

7.2. Kristallographische Statistiken

Tabelle 18. Datensammlung und Strukturverfeinerung von *PcIDS1*-Kristallen

	<i>PcIDS1</i> _{apo}	<i>PcIDS1</i> _{Mg} IPP:IPP	<i>PcIDS1</i> _{Mn} IPP:IPP	<i>PcIDS1</i> _{Mn} IPP:IPP ano
Kristallparameter				
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellparameter	a=59.2 Å b=78.3 Å c=89.6 Å β=101.7°	a=57.4 Å b=72.4 Å c=84.9 Å β=101.5°	a=58.0 Å b=187.0 c=213.3 Å	a=58.0 Å b=187.0 c=213.3 Å
Untereinheiten / AE ^a	2	2	6	6
Datenaufnahme				
Beamline	X06SA, SLS	X06SA, SLS	X06SA, SLS	X06SA, SLS
Wellenlänge (Å)	1.0	1.0	1.0	1.89
Auflösungsbereich (Å) ^b	30-1.65 (1.75-1.65)	30-1.9 (2.0-1.9)	30-2.4 (2.5-2.4)	30-2.5 (2.6-2.5)
Anzahl Reflexe	292081	164221	606763	575468
Anzahl unabhängige Reflexe ^c	94381	52944	90473	148792 ^[*]
Vollständigkeit (%) ^b	98.0/98.4	98.3/98.2	98.7/99.0	96.1/93.3
R _{merge} (%) ^{b, d}	3.5/48.8	5.3/59.3	13.7/59.6	12.7/58.6
I/σ (I) ^b	16.4/2.4	11.8/2.0	10.5/3.8	7.3/2.0
Verfeinerung (REFMAC5)				
Auflösungsbereich (Å)	15-1.65	15-1.9	15-2.4	
Anzahl Reflexe (work)	89539	50190	85538	
Anzahl Reflexe (free)	4712	2642	4502	
Anzahl der Atome gesamt (ohne H)	5786	5690	17387	
Mg ²⁺ / Mn ²⁺	2/0	7/0	0/18	
Ligand	0	42	168	
Wasser	594	180	446	
R _{work} /R _{free} (%) ^e	15.3/19.4	16.4/20.2	22.4/26.8	
r.m.s.d. Bindung (Å) / Winkel (°) ^f	0.005/1.2	0.002/1.2	0.003/1.2	
B-Faktor-Mittel (Å ²)	36.9	33.3	33.8	
Ramachandran Plot (%) ^g	97.8/2.2/0	98.8/1.2/0	97.4/2.6/0	
PDB ID	8A6U	8A6V	8A6Z	

[a] Asymmetrische Einheit

[b] Die Werte in Klammern, bzw. nach dem Trennstrich bei Auflösungsbereich, Vollständigkeit, R_{merge} und I/σ (I) entsprechen der höchsten Auflösungsschale.

[c] Datenreduktion wurde mit XDS von einem Einzelkristall durchgeführt. Friedel-Paare wurden als identische (oder individuelle^[*]) Reflexe betrachtet.

[d] $R_{\text{merge}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_j |I(\text{hkl})_j - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_j I(\text{hkl})_j}$, wobei $I(\text{hkl})_j$ die j-ste Messung der Intensität des Reflexes hkl ist und $\langle I(\text{hkl}) \rangle$ die durchschnittliche Intensität angibt.

[e] $R = \frac{\sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|)}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$, wobei R_{free} ohne Sigma-Cutoff für zufällig ausgewählte 5 % der Reflexe angegeben ist, welche nicht Teil der Strukturverfeinerung sind. R_{work} berechnet sich aus den verbleibenden Reflexen.

[f] Abweichungen von idealen Bindungslängen und -winkeln.

[g] Anteil der Aminosäurereste in präferierten / erlaubten / außenliegenden Regionen des Plots.

	<i>PcIDS1</i> _{Mg} GPP	<i>PcIDS1</i> _{Mn} GPP	<i>PcIDS1</i> _{Mn} GPP ano	<i>PcIDS1_F315A</i> _{Mg} 2GPP
Kristallparameter				
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Zellparameter	a=59.3 Å b=77.3 Å c=88.7 Å β=101.4°	a=59.1 Å b=78.4 Å c=87.3 Å β=101.7°	a=59.1 Å b=78.4 Å c=87.3 Å β=101.7°	a=59.2 Å b=78.3 Å c=89.3 Å β=101.8°
Untereinheiten / AE ^a	2	2	2	2
Datenaufnahme				
Beamline	X06SA, SLS	X06SA, SLS	X06SA, SLS	X06SA, SLS
Wellenlänge (Å)	1.0	1.0	1.89	1.0
Auflösungsbereich (Å) ^b	30-2.1 (2.2-2.1)	30-1.6 (1.7-1.6)	30-2.15 (2.25-2.15)	30-1.9 (2.0-1.9)
Anzahl Reflexe	127936	271562	265577	209553
Anzahl unabhängige Reflexe ^c	44714	97381	81096 ^[*]	61843
Vollständigkeit (%) ^b	97.2/96.7	94.7/97.8	97.1/91.9	98.3/99.4
R _{merge} (%) ^{b, d}	7.8/56.2	5.2/52.2	6.6/36.2	9.4/53.8
I/σ (I) ^b	8.1/2.0	10.1/2.0	10.8/2.7	6.9/2.4
Verfeinerung (REFMAC5)				
Auflösungsbereich (Å)	15-2.1	15-1.6		15-1.9
Anzahl Reflexe (work)	42358	92404		58621
Anzahl Reflexe (free)	2229	4863		3086
Anzahl der Atome gesamt (ohne H)	5523	5965		5602
Mg ²⁺ / Mn ²⁺	5/0	2/2		8/0
Ligand	19	76		38
Wasser	160	346		222
R _{work} /R _{free} (%) ^c	17.6/22.2	15.9/19.4		19.9/24.1
r.m.s.d. Bindung (Å) / Winkel (°) ^f	0.002/1.1	0.003/1.2		0.002/1.2
B-Faktor-Mittel (Å ²)	40.2	29.6		34.1
Ramachandran Plot (%) ^g	98.6/1.4/0	98.0/2.0/0		98.6/1.4/0
PDB ID	8A70	8A73		8A74

^[a] Asymmetrische Einheit

^[b] Die Werte in Klammern, bzw. nach dem Trennstrich bei Auflösungsbereich, Vollständigkeit, R_{merge} und I/σ (I) entsprechen der höchsten Auflösungsschale.

^[c] Datenreduktion wurde mit XDS von einem Einzelkristall durchgeführt. Friedel-Paare wurden als identische (oder individuelle^[*]) Reflexe betrachtet.

^[d] $R_{\text{merge}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_j |I(\text{hkl})_j - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_j I(\text{hkl})_j}$, wobei $I(\text{hkl})_j$ die j-ste Messung der Intensität des Reflexes hkl ist und $\langle I(\text{hkl}) \rangle$ die durchschnittliche Intensität angibt.

^[e] $R = \frac{\sum_{\text{hkl}} | |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| |}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$, wobei R_{free} ohne Sigma-Cutoff für zufällig ausgewählte 5 % der Reflexe angegeben ist, welche nicht Teil der Strukturverfeinerung sind. R_{work} berechnet sich aus den verbleibenden Reflexen.

^[f] Abweichungen von idealen Bindungslängen und -winkeln.

^[g] Anteil der Aminosäurereste in präferierten / erlaubten / außenliegenden Regionen des Plots.

	<i>PcIDS1_F315A</i> _{Mg/Mn} GPP:PP	<i>PcIDS1</i> _{Mg} 3-Br-GPP	<i>PcIDS1_D319N</i> _{Mg} 3-Br-GPP	<i>PcIDS1</i> _{Mg} ZOL:IPP
Kristallparameter				
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Zellparameter	a=59.1 Å b=78.8 Å c=88.5 Å β=102.2°	a=59.5 Å b=78.3 Å c=88.9 Å β=101.5°	a=59.3 Å b=78.0 Å c=88.7 Å β=101.3°	a=58.0 Å b=71.0 Å c=94.1 Å β=91.6°
Untereinheiten / AE ^a	2	2	2	2
Datenaufnahme				
Beamline	X06SA, SLS	X06SA, SLS	X06SA, SLS	X06SA, SLS
Wellenlänge (Å)	1.0	0.92	0.92	1.0
Auflösungsbereich (Å) ^b	30-1.6 (1.7-1.6)	30-1.6 (1.7-1.6)	30-1.65 (1.75-1.65)	30-1.2 (1.3-1.2)
Anzahl Reflexe	307971	515622	546209	817710
Anzahl unabhängige Reflexe ^c	98744	201678 ^[*]	184588 ^[*]	234153
Vollständigkeit (%) ^b	94.5/92.5	97.3/97.5	98.4/99.1	98.5/98.0
R _{merge} (%) ^{b, d}	5.0/54.2	4.7/52.7	4.1/52.2	7.0/46.3
I/σ (I) ^b	11.4/2.0	9.7/2.0	13.2/2.1	7.8/2.0
Verfeinerung (REFMAC5)				
Auflösungsbereich (Å)	15-1.6	15-1.6	15-1.65	15-1.2
Anzahl Reflexe (work)	93694	98531	89533	222321
Anzahl Reflexe (free)	5747	5186	4712	11701
Anzahl der Atome gesamt (ohne H)	5747	5908	5742	6476
Mg ²⁺ / Mn ²⁺	3/1	5/0	5/0	6/0
Ligand	28	19	19	60
Wasser	354	513	312	731
R _{work} /R _{free} (%) ^e	14.8/18.9	19.2/15.8	15.5/17.5	12.8/15.3
r.m.s.d. Bindung (Å) / Winkel (°) ^f	0.006/1.4	0.003/1.2	0.003/1.2	0.014/1.8
B-Faktor-Mittel (Å ²)	27.2	30.6	28.0	18.4
Ramachandran Plot (%) ^g	98.1/1.9/0	98.0/2.0/0	98.4/1.6/0	98.5/1.5/0
PDB ID	8A78	8A7A	8A7B	8A7C

^[a] Asymmetrische Einheit

^[b] Die Werte in Klammern, bzw. nach dem Trennstrich bei Auflösungsbereich, Vollständigkeit, R_{merge} und I/σ (I) entsprechen der höchsten Auflösungsschale.

^[c] Datenreduktion wurde mit XDS von einem Einzelkristall durchgeführt. Friedel-Paare wurden als identische (oder individuelle^[*]) Reflexe betrachtet.

^[d] $R_{\text{merge}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_j |I(\text{hkl})_j - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_j I(\text{hkl})_j}$, wobei $I(\text{hkl})_j$ die j-ste Messung der Intensität des Reflexes hkl ist und $\langle I(\text{hkl}) \rangle$ die durchschnittliche Intensität angibt.

^[e] $R = \frac{\sum_{\text{hkl}} | |F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}| |}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$, wobei R_{free} ohne Sigma-Cutoff für zufällig ausgewählte 5 % der Reflexe angegeben ist, welche nicht Teil der Strukturverfeinerung sind. R_{work} berechnet sich aus den verbleibenden Reflexen.

^[f] Abweichungen von idealen Bindungslängen und -winkeln.

^[g] Anteil der Aminosäurereste in präferierten / erlaubten / außenliegenden Regionen des Plots.

	<i>Pc</i> IDS1 _{Mn} ZOL:IPP	<i>Pc</i> IDS1 _{Mn} ZOL:IPP ano	<i>Pc</i> IDS1 _{Mn (low)} ZOL:IPP	<i>Pc</i> IDS1 _{Mn (low)} ZOL:IPP ano
Kristallparameter				
Raumgruppe	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
Zellparameter	a=57.8 Å b=70.6 Å c=94.1 Å β=91.4°	a=57.8 Å b=70.6 Å c=94.1 Å β=91.4°	a=58.1 Å b=70.5 Å c=94.9 Å β=91.3°	a=58.1 Å b=70.5 Å c=94.9 Å β=91.3°
Untereinheiten / AE ^a	2	2	2	2
Datenaufnahme				
Beamline	X06SA, SLS	X06SA, SLS	X06SA, SLS	X06SA, SLS
Wellenlänge (Å)	1.0	1.89	1.0	1.89
Auflösungsbereich (Å) ^b	30-1.2 (1.3-1.2)	30-2.2 (2.3-2.2)	30-1.3 (1.4-1.3)	30-2.2 (2.3-2.2)
Anzahl Reflexe	735866	232317	559331	246713
Anzahl unabhängige Reflexe ^c	229848	73237 ^[*]	180288	72747 ^[*]
Vollständigkeit (%) ^b	97.5/97.6	96.9/94.9	96.0/94.4	95.2/92.1
R _{merge} (%) ^{b, d}	3.6/45.4	4.5/11.7	4.3/55.2	5.4/14.6
I/σ (I) ^b	13.8/2.1	18.0/7.6	12.1/2.1	5.9/15.5
Verfeinerung (REFMAC5)				
Auflösungsbereich (Å)	15-1.2		15-1.3	
Anzahl Reflexe (work)	218246		171154	
Anzahl Reflexe (free)	11487		9008	
Anzahl der Atome gesamt (ohne H)	6508		6325	
Mg ²⁺ / Mn ²⁺	0/6		6/6	
Ligand	60		60	
Wasser	742		524	
R _{work} /R _{free} (%) ^c	13.2/15.2		14.2/16.8	
r.m.s.d. Bindung (Å) / Winkel (°) ^f	0.011/1.7		0.018/2.1	
B-Faktor-Mittel (Å ²)	17.8		19.3	
Ramachandran Plot (%) ^g	98.3/1.7/0		98.2/1.8/0	
PDB ID	8A7J		8A7K	

[a] Asymmetrische Einheit

[b] Die Werte in Klammern, bzw. nach dem Trennstrich bei Auflösungsbereich, Vollständigkeit, R_{merge} und I/σ (I) entsprechen der höchsten Auflösungsschale.

[c] Datenreduktion wurde mit XDS von einem Einzelkristall durchgeführt. Friedel-Paare wurden als identische (oder individuelle^[*]) Reflexe betrachtet.

[d] $R_{\text{merge}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_j |I(\text{hkl})_j - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_j I(\text{hkl})_j}$, wobei $I(\text{hkl})_j$ die j-ste Messung der Intensität des Reflexes hkl ist und $\langle I(\text{hkl}) \rangle$ die durchschnittliche Intensität angibt.

[e] $R = \frac{\sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|)}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$, wobei R_{free} ohne Sigma-Cutoff für zufällig ausgewählte 5 % der Reflexe angegeben ist, welche nicht Teil der Strukturverfeinerung sind. R_{work} berechnet sich aus den verbleibenden Reflexen.

[f] Abweichungen von idealen Bindungslängen und -winkeln.

[g] Anteil der Aminosäurereste in präferierten / erlaubten / außenliegenden Regionen des Plots.

	<i>PcIDS1</i> _{Mg} ZOL:GPP	<i>PcIDS1_I420A</i> _{Mg} GPP:MES	<i>PcIDS1_F315D</i> _{Mg} GPP:GOL
Kristallparameter			
Raumgruppe	P3 ₂ 21	P2 ₁	P2 ₁
Zellparameter	a=86.2 Å b=86.2 Å c=119.6 Å	a=59.0 Å b=78.4 Å c=88.0 Å β=101.9°	a=59.0 Å b=78.1 Å c=88.1 Å β=101.4°
Untereinheiten / AE ^a	1	2	2
Datenaufnahme			
Beamline	X06SA, SLS	X06SA, SLS	X06SA, SLS
Wellenlänge (Å)	1.0	1.0	1.0
Auflösungsbereich (Å) ^b	30-1.85 (1.95-1.85)	30-2.0 (2.1-2.0)	30-1.55 (1.65-1.55)
Anzahl Reflexe	125376	144572	296804
Anzahl unabhängige Reflexe ^c	43158	51160	107827
Vollständigkeit (%) ^b	97.1/99.4	96.2/98.6	94.9/98.2
R _{merge} (%) ^{b, d}	6.0/57.9	9.9/55.1	3.9/50.9
I/σ (I) ^b	9.5/2.0	6.9/2.4	13.1/2.1
Verfeinerung (REFMAC5)			
Auflösungsbereich (Å)	15-1.85	15-2.0	15-1.55
Anzahl Reflexe (work)	40913	48480	102435
Anzahl Reflexe (free)	2153	2551	5392
Anzahl der Atome			
gesamt (ohne H)	3048	5484	5762
Mg ²⁺ / Mn ²⁺	3/0	4/0	5/0
Ligand	19	31	25
Wasser	177	130	398
R _{work} /R _{free} (%) ^e	14.7/18.2	18.6/22.9	14.6/18.6
r.m.s.d. Bindung (Å) / Winkel (°) ^f	0.004/1.2	0.002/1.2	0.013/1.8
B-Faktor-Mittel (Å ²)	36.2	34.1	26.8
Ramachandran Plot (%) ^g	98.3/1.7/0	98.4/1.6/0	98.3/1.7/0
PDB ID	8A7L	8A7R	8A7U

^[a] Asymmetrische Einheit

^[b] Die Werte in Klammern, bzw. nach dem Trennstrich bei Auflösungsbereich, Vollständigkeit, R_{merge} und I/σ (I) entsprechen der höchsten Auflösungsschale.

^[c] Datenreduktion wurde mit XDS von einem Einzelkristall durchgeführt. Friedel-Paare wurden als identische (oder individuelle^[*]) Reflexe betrachtet.

^[d] $R_{\text{merge}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_j |I(\text{hkl})_j - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_j I(\text{hkl})_j}$, wobei $I(\text{hkl})_j$ die j-ste Messung der Intensität des Reflexes hkl ist und $\langle I(\text{hkl}) \rangle$ die durchschnittliche Intensität angibt.

^[e] $R = \frac{\sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|)}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$, wobei R_{free} ohne Sigma-Cutoff für zufällig ausgewählte 5 % der Reflexe angegeben ist, welche nicht Teil der Strukturverfeinerung sind. R_{work} berechnet sich aus den verbleibenden Reflexen.

^[f] Abweichungen von idealen Bindungslängen und -winkeln.

^[g] Anteil der Aminosäurereste in präferierten / erlaubten / außenliegenden Regionen des Plots.

Tabelle 19. Datensammlung und Strukturverfeinerung von MstE-Kristallen.

	MstE_{apo}	MstE:Fs-DHB	MstE D109A:MA
Kristallparameter			
Raumgruppe	P1	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellparameter	a=48,5 Å	a=48,0 Å	a=48,0 Å
	b=48,6 Å	b=77,4 Å	b=76,8 Å
	c=78,0 Å	c=90,9 Å	c=91,3 Å
	α=89,0°		
	β=100,0°		
	γ=101,9°		
Untereinheiten / AE ^a	2	1	1
Datenaufnahme			
Beamline	X06SA, SLS	X06SA, SLS	X06SA, SLS
Wellenlänge (Å)	1,0	1,0	1,0
Auflösungsbereich (Å) ^b	30-1,95	30-1,35	30-1,4
	(2,05-1,95)	(1,45-1,35)	(1,5-1,4)
Anzahl Reflexe	106013	275959	342314
Anzahl unabhängige Reflexe ^c	46089	72004	66812
Vollständigkeit (%) ^b	92,2/92,5	95,9/98,1	99,4/99,3
R _{merge} (%) ^{b, d}	4,9/54,9	4,1/58,2	5,3/50,1
I/σ (I) ^b	9,4/2,0	15,7/2,6	16,0/3,5
Verfeinerung (REFMAC5)			
Auflösungsbereich (Å)	15-1,95	15-1,35	15-1,4
Anzahl Reflexe (work)	43775	68352	63405
Anzahl Reflexe (free)	2304	3598	3337
Anzahl der Atome			
gesamt (ohne H)	5608	3128	3151
Ligand	0	26	31
Wasser	236	316	338
R _{work} /R _{free} (%) ^e	17,3/20,6	11,5/15,3	10,9/14,8
r.m.s.d. Bindung (Å) / Winkel (°) ^f	0,007/1,0	0,014/1,9	0,015/1,8
B-Faktor-Mittel (Å ²)	12,3	18,3	16,4
Ramachandran Plot (%) ^g	98,1/1,7/0,2	98,3/1,7/0,0	98,3/1,7/0,0
PDB ID	6SBB	6SBC	6SBD

^[a] Asymmetrische Einheit

^[b] Die Werte in Klammern, bzw. nach dem Trennstrich bei Auflösungsbereich, Vollständigkeit, R_{merge} und I/σ (I) entsprechen der höchsten Auflösungsschale.

^[c] Datenreduktion wurde mit XDS von einem Einzelkristall durchgeführt. Friedel-Paare wurden als identische (oder individuelle^[*]) Reflexe betrachtet.

^[d] $R_{\text{merge}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_j |I(\text{hkl})_j - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_j I(\text{hkl})_j}$, wobei $I(\text{hkl})_j$ die j-ste Messung der Intensität des Reflexes hkl ist und $\langle I(\text{hkl}) \rangle$ die durchschnittliche Intensität angibt.

^[e] $R = \frac{\sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|)}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$, wobei R_{free} ohne Sigma-Cutoff für zufällig ausgewählte 5 % der Reflexe angegeben ist, welche nicht Teil der Strukturverfeinerung sind. R_{work} berechnet sich aus den verbleibenden Reflexen.

^[f] Abweichungen von idealen Bindungslängen und -winkeln.

^[g] Anteil der Aminosäurereste in präferierten / erlaubten / außenliegenden Regionen des Plots.

	MstE_D109N:GG-DHB	MstE_Y157F_{apo}	MstE_R337A:GG-DHB
Kristallparameter			
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Zellparameter	a=47,8 Å b=77,3 Å c=91,2 Å	a=47,8 Å b=77,4 Å c=91,4 Å	a=48,0 Å b=77,8 Å c=91,6 Å
Untereinheiten / AE ^a	1	1	1
Datenaufnahme			
Beamline	X06SA, SLS	X06SA, SLS	X06SA, SLS
Wellenlänge (Å)	1,0	1,0	1,0
Auflösungsbereich (Å) ^b	30-1,4 (1,5-1,4)	30-1,3 (1,4-1,3)	30-2,3 (2,4-2,3)
Anzahl Reflexe	344128	431674	79847
Anzahl unabhängige Reflexe ^c	66882	83943	15698
Vollständigkeit (%) ^b	99,5/99,6	99,8/99,9	99,3/99,8
R _{merge} (%) ^{b, d}	5,6/53,7	4,4/56,2	13,7/57,0
I/σ (I) ^b	15,4/3,1	16,7/2,7	9,3/3,5
Verfeinerung (REFMAC5)			
Auflösungsbereich (Å)	15-1.4	15-1.3	15-2.3
Anzahl Reflexe (work)	63472	79680	14846
Anzahl Reflexe (free)	3340	4194	781
Anzahl der Atome			
gesamt (ohne H)	3228	3114	2890
Ligand	31	0	31
Wasser	324	332	91
R _{work} /R _{free} (%) ^e	10,1/13,8	11,5/14,7	18,5/22,9
r.m.s.d. Bindung (Å) / Winkel (°) ^f	0,015/1,9	0,015/1,9	0,002/0,94
B-Faktor-Mittel (Å ²)	17,4	19,3	30,3
Ramachandran Plot (%) ^g	98,3/1,7/0,0	98,2/1,8/0,0	98,6/1,4/0,0
PDB ID	6SBE	6SBF	6SBG

[^a] Asymmetrische Einheit

[^b] Die Werte in Klammern, bzw. nach dem Trennstrich bei Auflösungsbereich, Vollständigkeit, R_{merge} und I/σ (I) entsprechen der höchsten Auflösungsschale.

[^c] Datenreduktion wurde mit XDS von einem Einzelkristall durchgeführt. Friedel-Paare wurden als identische (oder individuelle^[*]) Reflexe betrachtet.

[^d] $R_{\text{merge}}(I) = \frac{\sum_{\text{hkl}} \sum_j |I(\text{hkl})_j - \langle I(\text{hkl}) \rangle|}{\sum_{\text{hkl}} \sum_j I(\text{hkl})_j}$, wobei $I(\text{hkl})_j$ die j-ste Messung der Intensität des Reflexes hkl ist und $\langle I(\text{hkl}) \rangle$ die durchschnittliche Intensität angibt.

[^e] $R = \frac{\sum_{\text{hkl}} (|F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}|)}{\sum_{\text{hkl}} |F_{\text{obs}}|}$, wobei R_{free} ohne Sigma-Cutoff für zufällig ausgewählte 5 % der Reflexe angegeben ist, welche nicht Teil der Strukturverfeinerung sind. R_{work} berechnet sich aus den verbleibenden Reflexen.

[^f] Abweichungen von idealen Bindungslängen und -winkeln.

[^g] Anteil der Aminosäurereste in präferierten / erlaubten / außenliegenden Regionen des Plots.

7.3. Auswertung *PcIDS1*

Tabelle 20. RMSD-Werte zwischen den Untereinheiten der *PcIDS1*-Komplexe, sowie strukturell verwandter Proteine. Berechnung erfolgte durch Top3D.⁹⁹

Untereinheit 1	PDB ID ^[a]	Untereinheit 2	PDB ID ^[a]	RMSD-Wert [Å]	Anzahl C _α in Überlagerung
<i>Gg</i> FPPS ^[b]	1UBX	<i>PcIDS1</i> _{apo}	8A6U_A	1.2	291
<i>Ec</i> FPPS ^[c] DMSPP:IPP	1RQI_A	<i>PcIDS1</i> _{Mg} IPP:IPP	8A6V_A	1.8	195
<i>Hs</i> FPPS ^[d] FPP	5JA0	<i>PcIDS1</i> _{Mn} GPP:GPP	8A73_A	1.0	300
<i>PcIDS1</i> _{apo}	8A6U_A	<i>PcIDS1</i> _{apo}	8A6U_B	0.6	314
<i>PcIDS1</i> _{Mg} IPP	8A6V_B	<i>PcIDS1</i> _{apo}	8A6U_A	0.7	308
<i>PcIDS1</i> _{Mg} IPP:IPP	8A6V_A	<i>PcIDS1</i> _{Mg} IPP	8A6V_B	1.2	320
<i>PcIDS1</i> _{Mn} IPP:IPP	8A6Z_A	<i>PcIDS1</i> _{Mn} IPP:IPP	8A6Z_B	0.2	339
<i>PcIDS1</i> _{Mn} IPP:IPP	8A6Z_A	<i>PcIDS1</i> _{Mg} IPP:IPP	8A6V_A	0.2	342
<i>PcIDS1</i> _{Mg} GPP	8A70_A	<i>PcIDS1</i> _{Mg} IPP	8A6V_B	0.7	326
<i>PcIDS1</i> _{Mn} GPP:GPP	8A73_A	<i>PcIDS1</i> _{Mg} GPP	8A70_A	0.4	333
<i>PcIDS1</i> _F315A _{Mg} 2GPP	8A74_A	<i>PcIDS1</i> _{Mg} GPP	8A70_B	0.2	334
<i>PcIDS1</i> _F315A _{Mg} 2GPP	8A74_A	<i>PcIDS1</i> _F315A _{Mg} 2GPP	8A74_B	0.4	314
<i>PcIDS1</i> _{Mg} 3-Br-GPP	8A7A_A	<i>PcIDS1</i> _{Mg} GPP	8A70_A	0.2	334
<i>PcIDS1</i> _{Mg} ZOL:IPP	8A7C_A	<i>PcIDS1</i> _{Mg} IPP:IPP	8A6V_A	0.3	341
<i>PcIDS1</i> _{Mg} ZOL:IPP	8A7C_A	<i>PcIDS1</i> _{Mg} ZOL:IPP	8A7C_B	0.4	339
<i>PcIDS1</i> _{Mn} ZOL:IPP	8A7J_A	<i>PcIDS1</i> _{Mn} ZOL:IPP	8A7J_B	0.5	339
<i>PcIDS1</i> _{Mn} ZOL:IPP	8A7J_A	<i>PcIDS1</i> _{Mg} ZOL:IPP	8A7C_A	0.1	345
<i>PcIDS1</i> _{Mg} ZOL:GPP	8A7L	<i>PcIDS1</i> _{Mg} ZOL:IPP	8A7C_A	0.4	338

^[a] Kettenbezeichnung analog zum Datensatz der PDB.

^[b] *Gallus gallus*

^[c] *Escherichia coli*

^[d] *Homo sapiens*

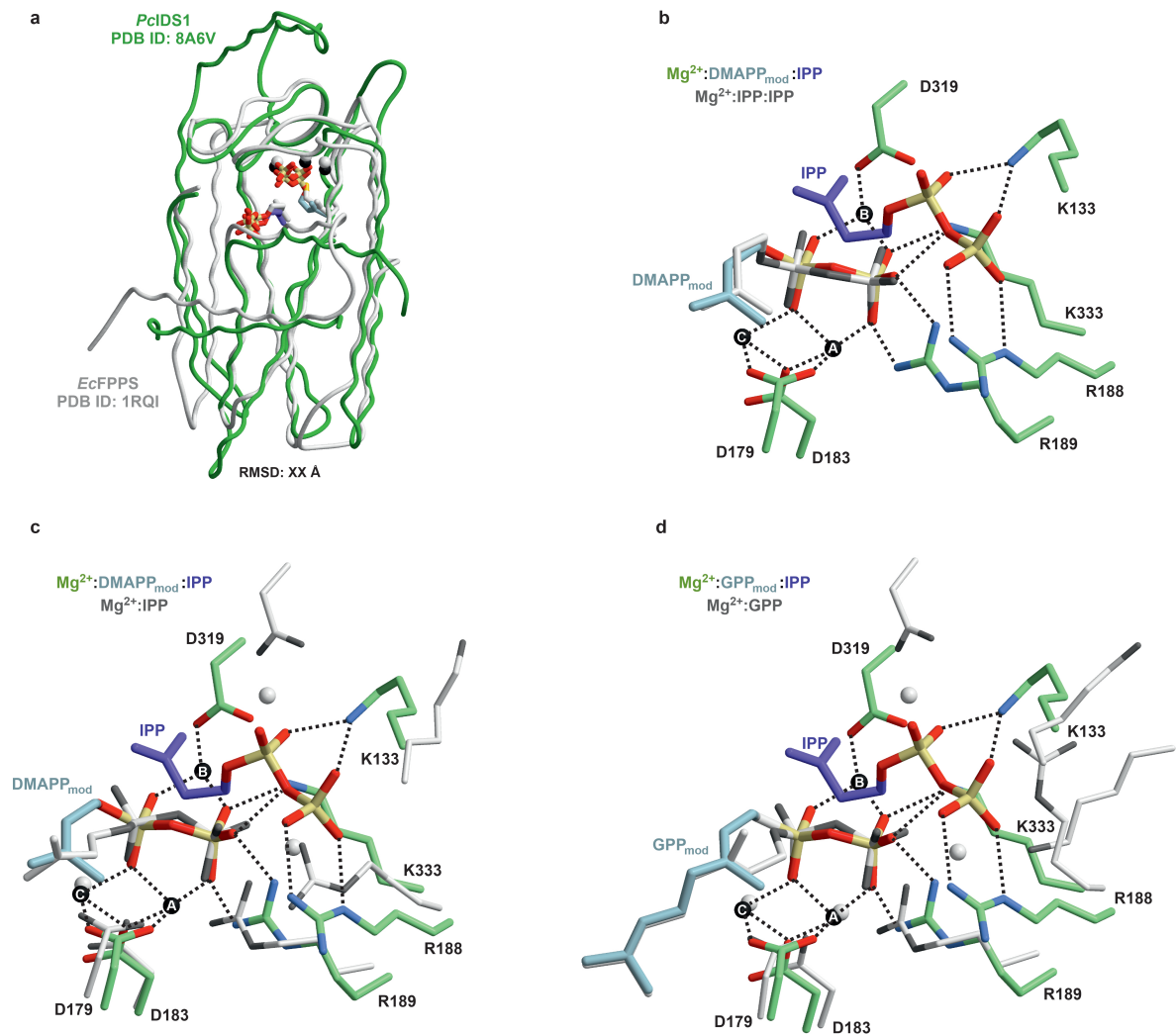


Abbildung A1. Modellierung von DMAPP_{AI} und GPP_{AI} im geschlossenen Zustand. **a**, Die Untereinheit PcIDS1_{Mg}:IPP:IPP (grün) zeigt strukturelle Übereinstimmung mit der *E. coli* FPPS-Komplexstruktur in Gegenwart von Dimethylallyl-*S*-thiolodiphosphat (DMSPP) und IPP.¹³² **b**, Die AI-Stelle mit DMAPP_{mod} (modelliert aus DMSPP) und IPP_{HAI} zeigt die Bindemodi der nativen Substrate. IPP_{AI} nimmt im geschlossenen Zustand die gleiche Konformation ein wie DMAPP_{mod}. **c**, Die Überlagerung von PcIDS1_{Mg}:DMAPP_{mod}:IPP und PcIDS1_{Mg}:IPP betont die Umlagerung der Prenyleinheit von DMAPP durch IPP_{HAI}-Bindung. Die Überlagerung von PcIDS1_{Mg}:GPP_{mod}:IPP und PcIDS1_{Mg}:GPP weist auf eine ähnliche Reorientierung von GPP_{AI} während der FPP-Bildung hin. GPP_{mod} wurde auf Grundlage von DMAPP_{mod} und PcIDS1_{Mg}:GPP modelliert. Darstellung in Anlehnung an Ecker et al.¹⁵

Tabelle 21. Die drei besten Treffer strukturell verwandter Proteine aus einer DALI-Suche.¹¹¹

PDB ID	Z-Wert	R.m.s.d. [Å]	Identität [%]	PDB-Eintrag
2SQC	31.1	2.7	21	Squalene-hopene cyclase from <i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> ⁷⁸
5BP8	27.9	2.4	22	Ent-copalyl diphosphate synthase from <i>Streptomyces platensis</i> ⁸⁷
1W6K	27.0	2.7	20	Structure of human OSC in complex with Lanosterol ⁸⁵

7.4. Auswertung MstE

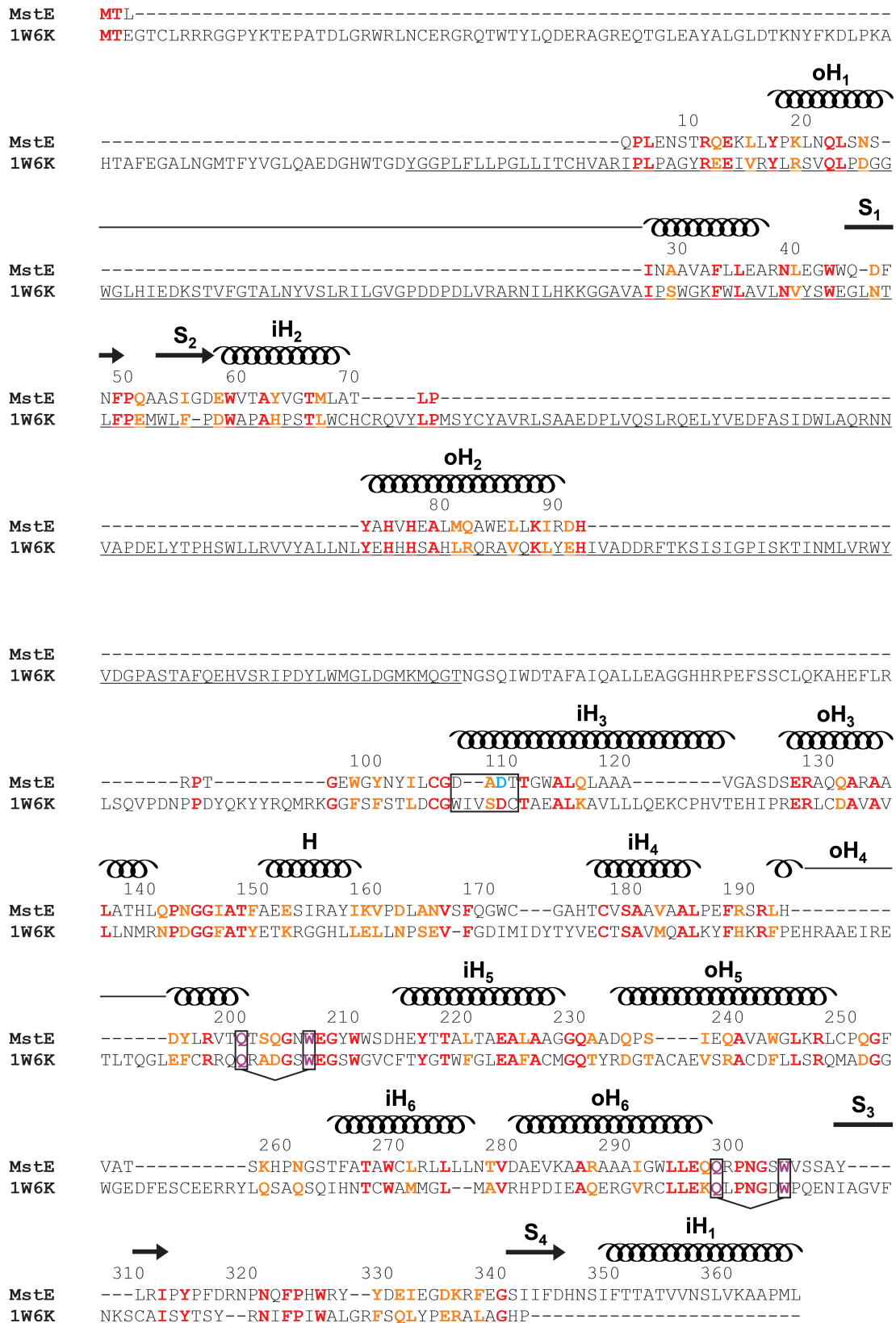


Abbildung A2. Primärsequenz-Alignment zwischen MstE und HsOSC (PDB ID: 1W6K⁸⁵). Identische Positionen sind rot, konservierte Aminosäurereste orange eingefärbt. Die QW-Motive von MstE, sowie das katalytische Aspartat sind lila, bzw. blau markiert. Die Nomenklatur der Sekundärstrukturelemente von MstE entspricht Abb. 27b. Die γ -Domäne von HsOSC ist unterstrichen. Darstellung in Anlehnung an Moosmann et al.⁸²

8. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in begutachteten Journalen veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung eingereicht:

- 2022 Ecker F., Vattekkatte A., Boland W., Groll M., “Metal-dependent enzyme symmetry guides the biosynthetic flux of terpene precursors”
*Manuskript eingereicht*¹
- 2020 Moosmann P.*, Ecker F.*, Leopold-Messer S., Cahn J. K. B., Dieterich C. L., Groll M., Piel J., “A monodomain class II terpene cyclase assembles complex isoprenoid scaffolds”, *diese Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen
Nature Chemistry, 12, 968-72

Publikationen, die nicht Teil dieser Arbeit sind:

- 2022 Kaspers M., Pogenberg V., Pett C., Ernst S., Ecker F., Ochtrop P., Groll M., Hedberg C., Itzen A., “Dephosphocholination by *Legionella* effector Lem3 functions through remodelling of the switch II region of Rab1b”
*Manuskript eingereicht*²
- Auman D.*, Ecker F.*, Mader S. L.*, Dorst K. M., Bräuer A., Widmalm G., Groll M., Kaila V. R. I., “Peroxy Intermediate Drives Carbon Bond Activation in the Dioxygenase AsqJ”, *diese Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen
J. Am. Chem. Soc., 144 (34), 15622-32
- 2020 Ernst S.*, Ecker F.*, Kaspers M. S.*, Ochtrop P., Hedberg C., Groll M., Itzen A., “*Legionella* effector AnkX displaces the switch II region for Rab1b phosphocholination”, *diese Autoren haben zu gleichen Teilen beigetragen
Science Advances, 6 (20), eaaz8041
- 2018 Ecker F., Haas H., Groll M., Huber E. M., “Iron scavenging in *Aspergillus* species: Structural and biochemical insights into fungal siderophore esterases”
Angewandte Chemie International Edition, 57 (44), 14624-9
- Wachtel R., Bräuning B., Mader S. L., Ecker F., Kaila V. R. I., Groll M., Itzen A., “The protease GtgE from *Salmonella* exclusively targets inactive Rab GTPases”
Nature Communications, 9 (44), 1-13

¹⁻² siehe Anmerkung zur Veröffentlichung der Dissertation (Seite 80)

Anmerkung zur Veröffentlichung der Dissertation:

Kurz nach Verteidigung der vorliegenden Arbeit wurden folgende Manuskripte zur Publikation angenommen. Hierdurch ändern sich die Quellenangaben wie folgt:

- ¹**2023** **Ecker F.**, Vattekkatte A., Boland W., Groll M., “Metal-dependent enzyme symmetry guides the biosynthetic flux of terpene precursors”
Nature Chemistry, doi: 10.1038/s41557-023-01235-9
Online ahead of print (June 12th 2023)
- ²**2023** Kaspers M., Pogenberg V., Pett C., Ernst S., **Ecker F.**, Ochtrop P., Groll M., Hedberg C., Itzen A., “Dephosphocholination by *Legionella* effector Lem3 functions through remodelling of the switch II region of Rab1b”
Nature Communications, 14 (2245), 1-15

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt:

Prof. Dr. Michael Groll für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seinem Lehrstuhl durchzuführen und die große Freiheit, die ich während der Forschung an zahlreichen spannenden Projekten stets genoss. Ohne sein uneingeschränktes Vertrauen in und unermüdliches Interesse an allen wissenschaftlichen wie persönlichen Belangen, hätte diese Promotionsarbeit nicht entstehen können.

Meiner Promotionsbetreuerin PD Dr. Eva Huber und ihrem wissenschaftlichen Einsatz für die Arbeitsgruppe, sowie die tatkräftige Unterstützung beim Verfassen meiner Publikationen.

Meinen Kooperationspartnern, insbesondere Prof. em. Dr. Wilhelm Boland und Prof. Dr. Jörn Piel, sowie ihren Mitarbeitern Dr. Abith Vattekkatte und Dr. Philipp Moosmann für den wertvollen wissenschaftlichen Austausch.

Astrid König für ihren unermüdlichen Einsatz für den Lehrstuhl und kompromisslose Unterstützung bei allen persönlichen Belangen.

Meinen Kollegen Dr. Wolfgang Heinemeyer, Maximilian Schmalhofer, Thomas Badmann, Julia Hirschmann, Wolfgang Kutenlochner und Rachel Sonntag für die stets herzliche und produktive Arbeitsatmosphäre.

Allen Alumni, insbesondere Dr. Christian Dubiella, Dr. Philipp Baer, Dr. Haissi Cui, Dr. Annika Frank, Dr. Camille LeChapelain, Dr. Marie-Theres Vielberg, Dr. Alois Bräuer und Dr. Bastian Bräuning, die mich einen Teil des Weges begleitet haben.

Den ehemaligen Studenten Marianne Volkmar, Julia Kasper, Anton Mühlbauer und Katharina Augustin, die im Rahmen eines Forschungspraktikums einen wertvollen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Dem wissenschaftlichen und technischen Personal der Beamline X06SA am Paul-Scherrer-Institut in Villigen für die Unterstützung bei der Datenerfassung.

Dem technischen Personal, allen Auszubildenden, Reinigungskräften, Mitarbeitern des technischen Betriebs, der Poststelle und Materialausgabe, Mechanikern sowie Handwerkern dafür, dass das Laborequipment und alle Räumlichkeiten überhaupt erst genutzt werden konnten.

Großer Dank gilt meinen Eltern und Schwiegereltern für ihre stets uneingeschränkte Unterstützung und Motivation während des Studiums und der Promotion.

Mein herzlichster Dank gilt meiner Frau Melanie, die mir immer zur Seite steht und den Rücken freihält, damit ich diese Arbeit anfertigen konnte. Und besonders unserer Tochter Elisabeth, die mir zu jeder Zeit ein Lichtblick ist.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Felix Ecker, erkläre hiermit, dass ich die beigefügte Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Garching, Oktober 2022

Felix Ecker