

Substratinduzierte Konformationsänderungen in Klasse-I-Terpen- cyclasen**

Philipp Baer, Patrick Rabe, Katrin Fischer, Christian A. Citron, Tim A. Klapschinski,
Michael Groll* und Jeroen S. Dickschat*

Abstract: Wir präsentieren kristallographische und funktionelle Daten einer Selina-4(15),7(11)-dien-Synthase (SdS) aus *Streptomyces pristinaespiralis* in offener und geschlossener (Ligand-gebundener) Konformation. Durch Analyse einer Substrat-induzierten Konformationsänderung des G1/2-Helixbruchmotivs wurde ein Induced-Fit-Mechanismus identifiziert. Diese Konformationsänderung hebt eine bis dahin unbeschriebene Effektortriade, bestehend aus dem Pyrophosphat-Sensor Arg178, dem Linker Asp181 und dem Effektor Gly182-O, hervor. Dieses Strukturmotiv ist hoch konserviert in Klasse-I-Terpencyclasen von Bakterien, Pilzen und Pflanzen, einschließlich der *epi*-Isozizäen-Synthase (3KB9), der Aristolochen-Synthase (4KUX), der Bornyldiphosphat-Synthase (1N20), der Limonen-Synthase (2ONG), der 5-*epi*-Aristolochen-Synthase (5EAT) und der Taxa-4(5),11(12)-dien-Synthase (3P5R). Strukturbasierte Mutageneseexperimente in Kombination mit der Analyse der Produktspektren stützen die mechanistischen Modelle der Carbokationbildung und -stabilisierung in der SdS.

Terpene – die größte Naturstoffklasse – werden ausgehend von Oligoprenyldiphosphaten durch Terpencyclasen gebildet. Diese hoch entwickelten Enzyme wandeln die Oligoprenyldiphosphate über kationische Intermediate in strukturell komplexe (poly)cyclische Kohlenwasserstoffe um.^[1] Terpencyclasen der Klasse I binden ihr Substrat durch die Koordinierung des Diphosphats an einen dreikernigen Mg²⁺-Cluster, der seinerseits durch ein aspartatreiches DDxD-

Motiv und eine NSE-Triade ND(L/I/V)xSxxE ausgerichtet wird. Diese strukturelle Anordnung kann in Enzymen aus Bakterien,^[2] Pilzen^[3,4] und Pflanzen^[5,6] beobachtet werden. Im Anschluss an die Substratbindung erfolgen die Abstraktion des Pyrophosphats (PP_i) und die Bildung des Allylkations. Nachfolgend findet die erste Cyclisierung durch einen intramolekularen Angriff der olefinischen Doppelbindung am Allylkation an C1 statt. Wie wir vor kurzer Zeit berichtet haben, erfolgt diese Cyclisierung durch Beteiligung eines Carbonylsauerstoffatoms, das im zentralen G1/2-Helixbruchmotiv lokalisiert ist, und durch den entsprechenden Helix-Dipol. Beide Komponenten sind perfekt für die Stabilisierung der positiven Ladung an C1 ausgerichtet.^[7] Das daraus resultierende Kation kann wiederum in ähnlicher Art und Weise cyclisieren. Diese Kaskade wird durch Deprotonierung oder durch Addition von H₂O beendet.^[8-11] Abgesehen von diesen bekannten Aspekten gibt es nur begrenzte Einblicke in die Bildung und Regulation des initialen Carbokations im Zuge der Substratbindung.^[2,12]

In Terpencyclasen ist die Konservierung der Aminosäuresequenz niedrig, die Enzymstrukturen weisen jedoch eine weit verbreitete α -helikale Faltung auf.^[13,14] Es werden Strukturveränderungen zwischen der offenen (apo) und der geschlossenen (Ligand-gebundenen) Konformation infolge von Metallionen- und Substratbindung beobachtet, die sich jedoch teilweise für Pflanzen^[5,15] und Pilze^[3,4] unterscheiden. Vor kurzem wurden Strukturdaten der bakteriellen *epi*-Isozizäen-Synthase (EIZS) aus *Streptomyces coelicolor* im Komplex mit PP_i-(Mg²⁺)₃-BTAC (BTAC = Benzyltriethylammonium-Kation), vier Hg²⁺-Ionen und der ligandfreien D99N-Mutante erhalten.^[2] Der Vergleich des PP_i-(Mg²⁺)₃-BTAC-gebundenen Enzyms mit dem EIZS-(Hg²⁺)₄-Komplex veranschaulicht eine ausgeprägte Konformationsänderung der Helix G. Es bleibt unklar, ob dies den natürlichen Zustand der apo-EIZS widerspiegelt oder ob eine durch die Hg²⁺-Bindung induzierte, artifizielle Konformation vorliegt. Hierfür spricht, dass die apo-D89N-Mutante keine Umlagerung der Helix G aufweist. Andere Strukturdaten von bakteriellen Terpencyclasen wurden entweder nur in einem Substrat-gebundenen oder einem ligandfreien Zustand erhalten,^[12,16] was einen konsistenten Einblick in die Substrat-induzierten Konformationsänderungen verwehrt. Die Strukturen der bakteriellen Selinadien-Synthase (SdS) aus *Streptomyces pristinaespiralis* in ihrer offenen Konformation (apo), im Komplex mit (Mg²⁺)₃ und dem unreaktiven Strukturanalogen 2,3-Dihydrofarnesyldiphosphat (DHFPP) sowie im Komplex mit (Mg²⁺)₃-PP_i ermöglichen bis dahin unbeschriebene Einblicke in den dynamischen Prozess von bakteriellen Terpencyclasen.

[*] P. Rabe,^[+] C. A. Citron, T. A. Klapschinski, Prof. Dr. J. S. Dickschat
Kekulé-Institut für Organische Chemie und Biochemie
Universität Bonn
Gerhard-Domagk-Straße 1, 53121 Bonn (Deutschland)
und
Institut für Organische Chemie
Technische Universität Braunschweig
Hagenring 30, 38106 Braunschweig (Deutschland)
E-Mail: j.dickschat@tu-bs.de

P. Baer,^[+] K. Fischer, Prof. Dr. M. Groll
Center for Integrated Protein Science at the Department Chemie
Lehrstuhl für Biochemie, TU München (Deutschland)
E-Mail: michael.groll@tum.de

[+] Diese Autoren trugen zu gleichen Teilen zu dieser Arbeit bei.

[**] Wir danken den Mitarbeitern des PXI vom Paul Scherrer Institut, Swiss Light Source (Villigen, Schweiz) für ihre Hilfe bei der kristallographischen Datenerfassung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DI1536/2-1 und DI1536/4-1) sowie vom Beilstein-Institut zur Förderung der Chemischen Wissenschaften mit einem Promotionsstipendium (an P.R.) gefördert.

 Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201403648> zu finden.

Für unsere detaillierte mechanistische Untersuchung wurde das Gen der Terpencyclase aus dem Actinobakterium *Streptomyces pristinaespiralis* ATCC 25486 (Zugangsnummer WP 005317515)^[17] kloniert und in *Escherichia coli* exprimiert, gefolgt von der Aufreinigung des Proteins in seiner aktiven Form. Das isolierte Enzym wurde sowohl mit einer Serie natürlicher (Oligo)prenyldiphosphate, einschließlich Dimethylallyl-PP (DMAPP), Geranyl-PP (GPP), Farnesyl-PP (FPP) und Geranylgeranyl-PP (GGPP), wie auch den nichtnatürlichen Substratanaloga (2Z,6E)-FPP, 2-Fluor-FPP (2F-FPP) und DHFPP inkubiert (für die Synthese: Abbildung 1 der Hintergrundinformationen (SI)).^[18–20] FPP ist das einzige Substrat, das in Selina-4(15),7(11)-dien (1) und geringe Mengen von Germacren B (2) umgesetzt wird (Abbildung 1; Tabelle 1 der SI). Die gleichzeitige Bildung von **1** und **2** ist verständlich, da **2** ein Intermediat der Reaktionskaskade von FPP zu **1** ist (Schema 1). Nach Abstraktion des PP_i vom

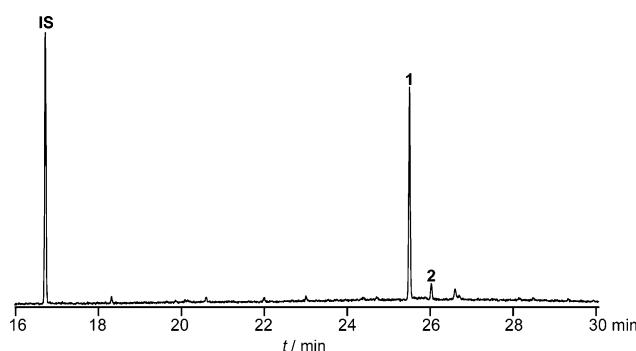
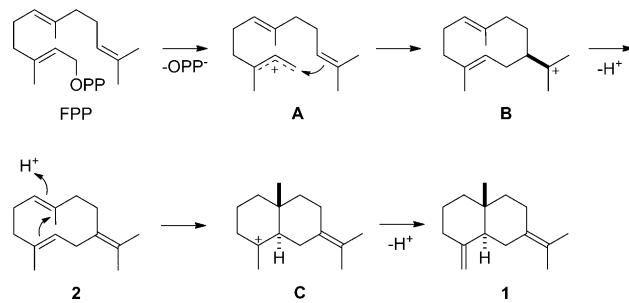


Abbildung 1. Produkte der SdS. Totalionenchromatogramm eines Extrakts von einem Inkubationsexperiment mit FPP und aufgereinigter SdS. Die Nummern verweisen auf die Verbindungen in Schema 1, IS = interner Standard (Dodecan).



Schema 1. Cyclisierung von FPP zu **1** durch SdS.

FPP wird das Allylkation **A** erhalten, das zu **B** cyclisiert und durch Deprotonierung zu **2** reagiert. Nach einer durch Re protonierung initiierten Reaktion zu **C** erfolgt eine Deprotonierung zu **1**. Die Bindung von FPP und seiner Analoga wurde qualitativ durch einen ThermoFluor-basierten Thermal-Shift-Assay untersucht (Abbildung 2 der SI).^[21]

Für fundierte Einblicke in den enzymatischen Mechanismus der Sesquiterpencyclasen wurden die Strukturen der SdS in ihrer offenen (apo: 2.1 Å und freier *R*-Faktor (*R*_{free}) = 20.3) und ihrer geschlossenen Konformation (gebunden an

DHFPP: 1.9 Å und *R*_{free} = 17.7; PP_i: 2.1 Å und *R*_{free} = 20.3) ermittelt (Abbildung 2; Tabelle 2 der SI). Das monomere Enzym besteht aus einer typischen α -Domäne. Zwischen den elf antiparallelen Helices bestehen kurze Linkersequenzen (Abbildung 3 der SI). Die zentrale Reaktionskammer wird durch die Helices B, C, G1/2, H und K gebildet; das DDxxD-Motiv befindet sich auf Helix C und die NSE-Triade auf Helix H.^[5,12] Infolge der Substratbindung findet eine Orientierung des hydrophoben Teils des Oligoprenyldiphosphats in die aktive Tasche und eine Konformationsänderung der C-Termini der Helices C (⁸⁵HCEE⁹⁴GELGHR⁹⁴), H (²³⁰HKERRGSG²³⁷) und K (³⁰⁷SSVRYTT³¹²PDDPANMPS³²²) statt.^[2]

Obwohl bereits vier bakterielle Terpencyclasen kristallisiert wurden^[2,7,12,16] und die Terpenbiochemie über kationische Intermediate gut dokumentiert ist,^[8,22] gibt es nur wenige Einblicke in den Mechanismus der Enzymfamilie. Bisher wurde vermutet, dass die Bildung des Carbokations in Terpencyclasen der Klasse I durch die Metallionen alleine initiiert wird und infolge der Koordinierung des Oligoprenyldiphosphats an den (Mg²⁺)₃-Cluster auftritt. Unsere Strukturdaten der SdS beschreiben nun das Zusammenspiel zwischen

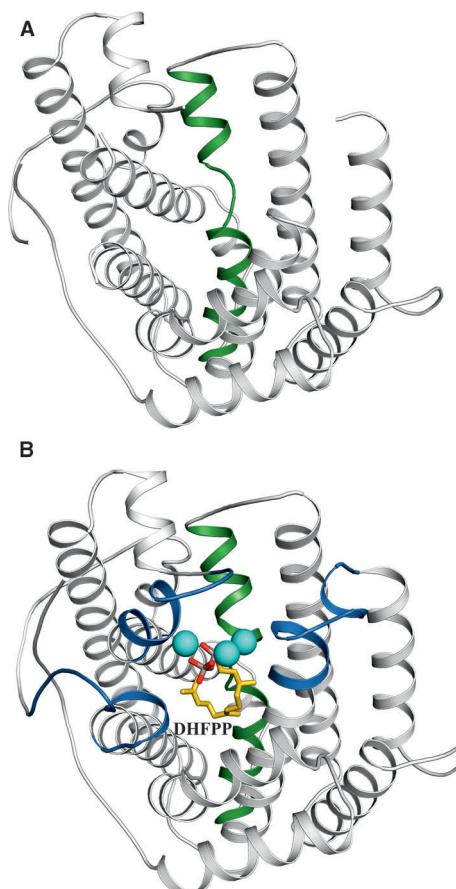


Abbildung 2. Struktur der SdS im Kristall. A) Bandenmodell der apo-SdS (offener Zustand) und B) der SdS im Komplex mit DHFPP (geschlossener Zustand). Die Helix G1/2 ist grün, DHFPP gelb, Sauerstoff rot, Phosphor dunkel lachsfarben und Mg²⁺ cyan dargestellt. Ungeordnete Elemente des apo-Enzyms, die durch die DHFPP-Koordinierung strukturiert werden, sind blau hervorgehoben.

Ligand und Enzym im Zuge der Substratbindung und der Schließung des aktiven Zentrums, das in der Bildung des Michaelis-Komplexes [SdS:FPP] resultiert und die Produktbildung initiiert. Entlang dieser Reaktionssequenz nimmt das zentrale G1/2-Helixbruchmotiv definierte Zustände zwischen der offenen (apo) und der geschlossenen (Substrat-gebundenen) Konformation an. Eine Strukturüberlagerung dokumentiert eindrucksvoll einen Induced-Fit-Mechanismus (Substrat-induzierte Zustandsänderung; Abbildung 3 A). Eine Überlagerung aller strukturell charakterisierten bakteriellen Enzyme demonstriert, dass die Gesamtorientierung der Helix G1 strikt konserviert ist, unabhängig davon, ob der Ligand gebunden ist oder das Enzym im apo-Zustand vorliegt (Abbildung 4 der SI). Die einzige davon abweichende (artifizielle) Struktur ist die E1ZS im Komplex mit 4 Hg^{2+} -Ionen, die eine signifikante Veränderung der gesamten G1-Helix aufweist. Unsere Daten decken eine neue, hoch konservierte Effektortriade auf, die einen PP_i -Sensor (Arg178), einen

Linker (Asp181) und einen Effektor (Gly182) umfasst. Diese Triade ist von genereller Bedeutung für bakterielle, pilzliche und pflanzliche Klasse-I-Terpenyclasen.

Im Zuge der Substratbindung reorientiert sich Arg178 um 3.8 Å zum Liganden. Hierbei werden zwei Wasserstoffbrücken (3.1 und 3.0 Å) zwischen der Guanidinogruppe und dem PP_i gebildet, die bereits in früheren Arbeiten beschrieben worden sind (Abbildung 3 A).^[2-4] Simultan erfolgt eine Neuorientierung von Asp181 um 3.3 Å, wobei eine H-Brücke mit Arg178 (2.9 Å) entsteht. Diese ternäre Koordination ist entscheidend für die Verknüpfung von Substratbindung mit der einhergehenden Konformationsänderung des G1-Helixbruchs. Aus diesem Grund ist Arg178 von essentieller Bedeutung für die Funktionalität, was durch umfassende Mutageneseexperimente bestätigt wurde (siehe unten). Durch diese strukturelle Modellierung erfolgt eine vollständige Neuanordnung des gesamten G1/2-Helixbruchmotivs, wodurch das katalytische Schlüssel-Carbonylsauerstoffatom von Gly182 (Gly182-O)^[5,7] um 5.1 Å in das aktive Zentrum verlagert wird. Das freie Elektronenpaar zeigt hierdurch direkt auf die C3-Position von DHFPP (3.4 Å), was im Falle der Bindung des natürlichen Substrats FPP zur Spaltung und Abstraktion des PP_i durch die Wechselwirkung mit dem π^* -Molekülorbital der 2,3-Doppelbindung führt, wodurch das Allylkation **A** gebildet wird. Da diese funktionelle Gruppe im gesättigten Substratanalogon nicht vorhanden ist, wird das Enzym im Substrat-gebundenen Zustand eingefroren und der Michaelis-Komplex imitiert. Weiterhin wird durch die Strukturdaten eine Plastizität des Helixbruchmotivs aufgezeigt, was bei der Überlagerung der Helices G1/2 des SdS: PP_i - und des SdS:DHFPP-Komplexes zu beobachten ist (Abbildung 3 B). Diese Überlagerung verdeutlicht, dass im Falle des SdS: PP_i -Komplexes das Gly182-O-Atom deutlich tiefer in das aktive Zentrum gerichtet ist als im SdS:DHFPP-Komplex. Wir schließen daraus, dass FPP oder dessen Analogon einer sterischen Abstoßung im Michaelis-Komplex unterliegt. Die Effektortriade aus Arg178, Asp181 und Gly182 ist strukturell in allen Klasse-I-Terpenyclasen strikt konserviert. In Bakterien und Pilzen ist der Pyrophosphatsensor auf Helix G1 lokalisiert, bei Pflanzen befindet sich dieser Sensor jedoch auf Helix H (Abbildung 3 C; Tabelle 3 der SI und Abbildung 4 der SI).^[5,6] Aus diesem Grund sind der Induced-Fit-Mechanismus und die Substratisierung durch das Carbonylsauerstoffatom (Gly182-O in der SdS) universell für alle Klasse-I-Terpenyclasen gültig.

Die mechanistischen Einblicke der Strukturdaten wurden durch Analysen von 28 Mutanten, die entsprechend ihrer mechanistischen Rolle in drei Klassen aufgeteilt wurden, bestätigt (Tabelle 1 der SI):

- 1) hydrophobe und aromatische Reste, die das aktive Zentrum konturieren^[12,23,24] und intermediäre Carbokationen stabilisieren^[3,12,22-24] hierdurch wird die chemische Natur des Produkts bestimmt;
- 2) Aminosäurereste, die in der Substratbindung und/oder Koordinierung des PP_i -(Mg^{2+})₃-H₂O-Clusters involviert sind;
- 3) katalytisch aktive Aminosäuren, die den Induced-Fit-Mechanismus, die G1/2-Helixbruch-Plastizität und die Substratisierung bewerkstelligen.

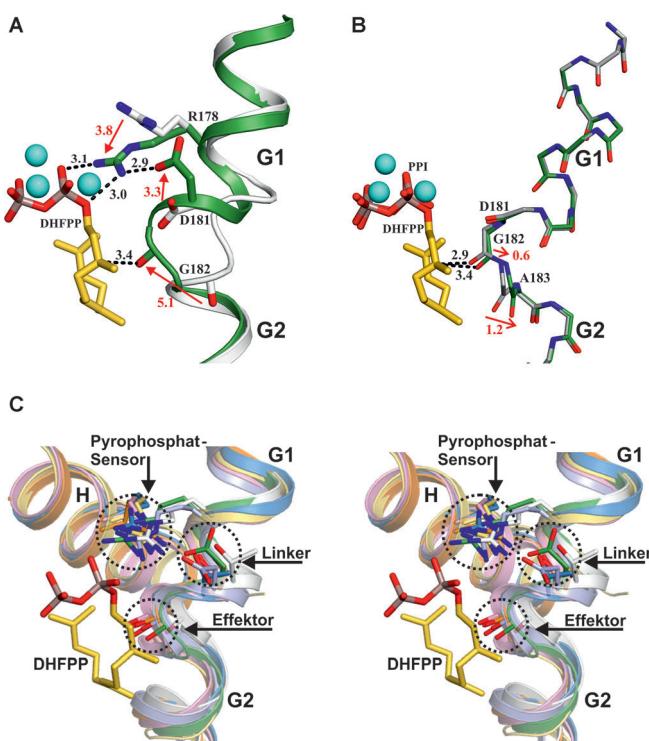


Abbildung 3. Nahaufnahme der G1-Helix und des Helixbruchmotivs. A) Strukturelle Überlagerung der G1/2-Helix in offenem (apo, hellgrau) und geschlossenem (DHFPP gebunden, grün) Zustand; der Farbcode ist analog dem in Abbildung 2. Wechselwirkungen sind als gestrichelte Linien dargestellt, Abstände sind in Å abgebildet. Rote Pfeile zeigen den Induced-Fit-Mechanismus zwischen der offenen und der geschlossenen Konformation. B) Strukturelle Überlagerung des Proteinrückgrats von SdS in Komplex mit PP_i (dunkelgrau) und DHFPP (grün). Beide Komplexe stellen die geschlossene Konformation dar. Stereobilder und die F_o - F_c -Elektronendichtheckarten von PP_i und DHFPP sind in Abbildungen 6 und 7 der SI gezeigt. C) Stereodarstellung der Strukturüberlagerung der Effektortriade, die den PP_i -Sensor, den Linker und den Effektor umfasst. Dargestellt sind: SdS:DHFPP (grün), E1ZS (grau, 3KB9),^[2] Aristolochen-Synthase (hellblau, 4KUX),^[25] Bornyldiphosphat-Synthase (pink, 1N20),^[26] Limonen-Synthase (orange, 2ONG),^[27] 5-*epi*-Aristolochen-Synthase (blau, 5EAT)^[5] und Taxadien-Synthase (3P5R, gelb).^[6]

Für Gruppe 1 wurde durch verschiedene Mutationen gezeigt, dass aromatische Aminosäuren eine Schlüsselrolle bei der Stabilisierung von Carbokationen spielen (Phe55, Phe79, Trp304, Tyr311; eine detaillierte Diskussion von allen Mutanten ist in den Abbildungen 8–11 der SI gegeben). Hierbei ist hervorzuheben, dass die F55L- und F79L-Mutanten drastisch veränderte Produktspektren gegenüber der Wildtyp-SdS aufzeigen, die außer den Produkten **1** und **2** auch die linearen Terpene (*E*)- β -Farnesen, (2*Z*,6*E*)- α -Farnesen und (2*E*,6*E*)- α -Farnesen umfassen (Abbildungen 8 und 9 der SI; abhängig von der Temperatureinstellung der Transferline des GC/MS kann Komponente **2** als thermisches Cope-Umlagerungsprodukt **2*** detektiert werden).

Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit vorherigen Mutationsstudien der EIZS^[2] und heben Phe55 bezüglich seiner Position zum DHFPP als essenziell für die Stabilisierung von Kation **B** hervor; Phe79 ist hingegen an Kation- π -Wechselwirkungen bei der Stabilisierung von Kation **A** beteiligt. Spätere Mutationen demonstrieren, dass die Wechselwirkung von Kation **C** mit aromatischen Aminosäuren nicht essenziell für die Bildung von **1** ist. Mutierte Reste aus Gruppe 2 sind Asp83 (D83N, D83E) und Glu159 (E159Q, E159D). Asp83 ist Teil des hoch konservierten DDxxD-Motivs und bildet zwei H-Brücken mit Arg310 und einem Wassermolekül, das den $(\text{Mg}^{2+})_3$ -Cluster koordiniert, wodurch bei Substratbindung Helix K mit Helix C verbrückt wird. Dieses verzahnte Netzwerk bewirkt die Schließung des aktiven Zentrums und eine definierte Orientierung des PP_i-Restes. Die Mutanten D83N und D83E bilden übwegend **2**, wobei im Falle von D83N die Aktivität stark reduziert ist. Die Bildung von **1** hingegen ist in diesen Mutanten inhibiert (Abbildung 12 der SI). Glu159 bildet H-Brücken zu zwei Wassermolekülen, die ebenso durch den $(\text{Mg}^{2+})_3$ -Cluster koordiniert sind. Dies sollte auch durch die Mutanten E159Q und E159D bewerkstelligt werden. Überraschenderweise wurde für beide Varianten ein nahezu vollständiger Verlust der Bildung von **1** beobachtet (Abbildung 13 der SI). Diese Inaktivität bezüglich der Konversion von **2** zu **1**, die sowohl für die Asp83- als auch für die Glu159-Mutanten beobachtet wurde, ist auf eine mögliche Fehlorientierung von PP_i zurückzuführen, das als Base/Säure agieren könnte^[23] und somit von genereller Bedeutung für die Protonierung von **2** und die Umwandlung in **1** ist.

Als nächstes wurden die Aminosäurereste der Gruppe 3 durch Mutagenese von Arg178, Asp181, Gly182, Ala183 und Tyr152 untersucht. Der Arg178-PP_i-Sensor bildet H-Brücken zwischen seiner Guanidinogruppe und dem PP_i des Substrates sowie zu einem Sauerstoffatom der Carboxygruppe von Asp181 (Asp181-O^{δ1}). Dementsprechend sind die R178N- und R178K-Mutanten inaktiv (Abbildung 14 der SI). Weiterhin trägt auch das Asp181-O^{δ1}-Atom zur Substrat-induzierten Konformationsänderung des Helixbruchs bei und fungiert als Linker zwischen dem PP_i-Sensor und dem Effektor Gly182-O. Die Mutanten D181N und D181S können Asp181 im H-Brückennetzwerk ersetzen, wie die von diesen Mutanten produzierten Mengen an **1** zeigen (Abbildung 15 der SI). Zweifellos kann dieser Linker zwischen Arg178 und Gly182 funktionell durch Asp, Thr, Ser und Asn realisiert werden, die in vielen Sesquiterpencyclasen an der entspre-

chenden Position zu finden sind (Abbildung 5 der SI, Position 8). Gemäß früheren Aussagen hat der Effektor Gly182-O die Schlüsselrolle für die Katalyse der Abstraktion der PP_i-Gruppe inne. Die Schließung des aktiven Zentrums und die Carbokation-Generierung wurden im Detail durch den Austausch von Gly182 durch zwei hydrophobe Aminosäurereste verschiedener Größe (Gly182A, Gly182V) sowie durch die Gly182P-Mutante untersucht. Durch die Substitution G182A werden nur kleine Mengen von **1** gebildet, wohingegen eine beträchtliche Zunahme von **2** zu beobachten ist. Im Unterschied dazu zeigt die Mutante G182V keine Terpenproduktion (Abbildung 16 der SI). Wie erwartet stört der G182P-Austausch die strukturelle Ausrichtung des Enzyms am G1/2-Helixbruch erheblich, wodurch ein inaktives Enzym resultiert. Eine nähere Betrachtung des offenen Zustandes der Wildtyp-SdS zeigt, dass die Seitenkette von Ala183 eine sterische Abstoßung bei der Schließung des aktiven Zentrums verursacht, gefolgt von einer Umlagerung von Tyr152 um 2.1 Å (Abbildung 17 der SI). Wird diese Aminosäure durch sterisch anspruchsvollere Reste wie A183V oder A183F ersetzt, wird das Enzym in der offenen Konformation fixiert, was zu seiner Inaktivierung führt (Abbildung 18 der SI). Im Einklang damit ist die Mutation des räumlich anspruchsvollen Tyr152 (Y152L, Y152W und Y152F) nicht kritisch (Abbildung 19 der SI).

Diese Befunde bekräftigen, dass die Koordination des Substrats an dem $(\text{Mg}^{2+})_3$ -Cluster nicht ausreichend für die Diphosphatabstraktion und Carbokationbildung ist. Wäre die Ionisierung allein von der Metallbindung abhängig und würden die Mutationen von Gly182 und Ala183 nur die Cyclisierungskaskade behindern, sollte zumindest die Bildung von Farnesenen in den jeweiligen Mutanten nachgewiesen werden. Aus diesem Grund belegen unsere Mutagenese-Experimente klar die Bedeutung des Induced-Fit-Mechanismus, dem die neu identifizierte Effektortriade als treibende dynamische Kraft für die Konformationsänderung zwischen dem offenen und dem geschlossenen Zustand zugrunde liegt. Diese Konformationsänderungen sind essenziell für die effiziente Katalyse durch Klasse-I-Terpencyclasen und deren progressiven Substratumsatz (Abbildung 4).

Die hier vorgestellte Arbeit erläutert die Substratumsetzung in Klasse-I-Terpencyclasen in beispiellosem Detail. Eine neue Effektortriade wurde identifiziert, die auf der G1-Helix in der Nähe seines Helixbruchmotivs lokalisiert ist. Diese Einheit umfasst den hoch konservierten PP_i-Sensor Arg178, den Linker Asp181 und den Effektor Gly182-O. Es handelt sich hierbei um eine definierte Architektur, die auch in höheren Organismen wie Pflanzen und Pilzen strukturell erhalten ist und detaillierte Einblicke in die Generierung und Regulation von Carbokationen ermöglicht. Der Induced Fit sorgt dafür, dass in dieser Klasse von Enzymen eine Produktbildung nur stattfindet, wenn das aktive Zentrum fest verschlossen und nicht für Lösungsmittel zugänglich ist. Darüber hinaus schlagen wir vor, dass die Bildung des Carbokations in Klasse-I-Terpencyclasen primär durch das Carbonylsauerstoffatom des G1/2-Helixbruchmotivs (Gly182-O) ausgelöst wird. Das umfassende mechanistische Verständnis der Klasse-I-Terpencyclasen könnte zur ihrer zukünftigen

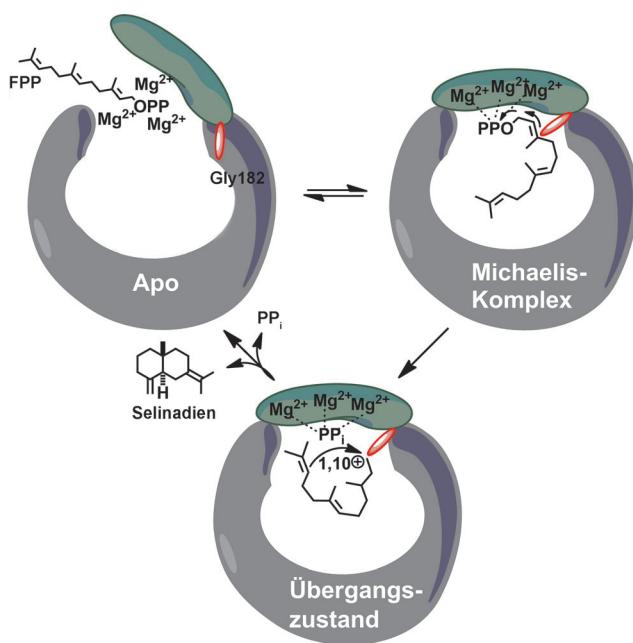


Abbildung 4. In der apo-Konformation ist das aktive Zentrum für die FPP-Bindung zugänglich, die Carbonylgruppe von Gly182 (rot) ist der zentralen Kavität abgewendet. Im Zuge der Substratbindung bildet der PP_i-Sensor Arg178 H-Brücken zu (Mg²⁺)₃-FPP und dem Linker Asp181 (Abbildung 3 A); simultan erfolgt die Schließung des aktiven Zentrums. Der Effektor Gly182-O wird reorientiert und auf die C3-Position von FPP gerichtet, wodurch die Abstraktion von PP_i initiiert und das Farnesylykation gebildet wird. Dies ist der Start der Cyclisierungskaskade (Übergangszustand), die mit der 1,10-Cyclisierung beginnt. Sobald die Reaktion abgeschlossen und das Produkt freigesetzt wird, wechselt das Enzym zurück zur offenen apo-Konformation.

Anwendung in komplexer, semisynthetischer Chemie beitragen.

Eingegangen am 24. März 2014
Online veröffentlicht am 30. Mai 2014

Stichwörter: Biosynthese · Carbokationen · Enzymmodelle · Pyrophosphatsensoren · Terpene

[1] J. S. Dickschat, *Nat. Prod. Rep.* **2011**, *28*, 1917–1936.

- [2] J. A. Aaron, X. Lin, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2010**, *49*, 1787–1797.
- [3] M. J. Rynkiewicz, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 13543–13548.
- [4] E. Y. Shishova, L. Di Constanzo, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2007**, *46*, 1941–1951.
- [5] C. M. Starks, K. Back, J. Chappell, J. P. Noel, *Science* **1997**, *277*, 1815–1820.
- [6] M. Köksal, Y. Jin, R. M. Coates, R. Croteau, D. W. Christianson, *Nature* **2011**, *469*, 116–120.
- [7] P. Baer, P. Rabe, C. A. Citron, C. C. de Oliveira Mann, N. Kaufmann, M. Groll, J. S. Dickschat, *ChemBioChem* **2014**, *15*, 213–216.
- [8] D. Arigoni, *Pure Appl. Chem.* **1975**, *41*, 219–245.
- [9] D. E. Cane, M. Tandon, P. Prabhakaran, *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 8103–8106.
- [10] D. E. Cane, M. Tandon, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 5602–5603.
- [11] D. E. Cane, H. J. Ha, *J. Am. Chem. Soc.* **1986**, *108*, 3097–3099.
- [12] C. A. Lesburg, G. Zhai, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Science* **1997**, *277*, 1820–1824.
- [13] E. Oldfield, F. Y. Lin, *Angew. Chem.* **2012**, *124*, 1150–1163; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51*, 1124–1137.
- [14] D. W. Christianson, *Chem. Rev.* **2006**, *106*, 3412–3442.
- [15] H. A. Gennadios, V. Gonzalez, L. Di Costanzo, A. Li, F. Yu, D. J. Miller, R. K. Allemand, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2009**, *48*, 6175–6183.
- [16] M. Köksal, W. K. Chou, D. E. Cane, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2012**, *51*, 3011–3020.
- [17] P. Rabe, J. S. Dickschat, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 1855–1857; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 1810–1812.
- [18] J. Kim, S. Matsuyama, T. Suzuki, *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **2004**, *47*, 921–934.
- [19] G. L. Lange, C. Gottardo, *Synth. Commun.* **1990**, *20*, 1473–1479.
- [20] A. B. Woodside, Z. Huang, C. D. Poulter, *Org. Synth. Coll.* **1993**, *8*, 616–621.
- [21] F. H. Niesen, H. Berglund, M. Vedadi, *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2212–2221.
- [22] D. A. Dougherty, *Science* **1996**, *271*, 163–168.
- [23] J. M. Caruthers, I. Kang, M. J. Rynkiewicz, D. E. Cane, D. W. Christianson, *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 25533–25539.
- [24] N. L. Brock, S. R. Ravella, S. Schulz, J. S. Dickschat, *Angew. Chem.* **2013**, *125*, 2154–2158; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52*, 2100–2104.
- [25] M. Chen, N. Al-lami, M. Janvier, E. L. D'Antonio, J. A. Faraldo, D. E. Cane, R. K. Allemand, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2013**, *52*, 5441–5453.
- [26] D. A. Whittington, M. L. Wise, M. Urbansky, R. M. Coates, R. B. Croteau, D. W. Christianson, *Biochemistry* **2002**, *24*, 15375–15380.
- [27] D. C. Hyatt, B. Youn, Y. Zhao, B. Santhamma, R. M. Coates, R. B. Croteau, C. Kang, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 5360–5365.