

# **Biochemische Charakterisierung von PpoA aus *Aspergillus nidulans***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
**Florian Brodhun**  
aus  
Göttingen

Göttingen 2009

Referent: Prof. Dr. Ivo Feußner

Korreferent: Prof. Dr. Oliver Einsle

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2009

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Fettsäuren und Lipide .....	1
1.2 Die Oxylipin-Biosynthese in Pflanzen.....	2
1.2.1 Lipoxygenasen .....	2
1.2.2 Der Oxylipin-Stoffwechselweg in Pflanzen.....	3
1.3 Die Oxylipin-Biosynthese in Säugetieren .....	5
1.3.1 Prostaglandin-H <sub>2</sub> -Synthasen .....	6
1.3.2 Der Prostaglandin- und Leukotrien-Stoffwechselweg in Säugetieren.....	8
1.4 Die Oxylipin-Biosynthese in Pilzen.....	10
1.4.1 Prostaglandine in Pilzen.....	10
1.4.2 LOXen und LOX-Produkte in Pilzen .....	11
1.4.3 Linoleat-Diol-Synthasen (7,8-LDS) .....	13
1.4.4 Psi-Faktoren in <i>A. nidulans</i> .....	15
1.4.5 Die Familie der Psi-Faktor-produzierenden Oxygenasen (Ppo-Enzyme).....	16
1.5 Die Familie der Peroxidasen.....	17
1.6 Die Familie der Cytochrom-P450-Enzyme.....	17
1.7 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit .....	18
<b>2. Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
2.1 Materialien .....	19
2.1.1 Chemikalien .....	19
2.1.2 Molekularbiologische Reagenzien .....	19
2.1.3 Medien .....	20
2.1.4 Stämme .....	21
2.1.5 Vektoren .....	21
2.2 Geräte.....	22
2.3 Methoden.....	23
2.3.1 Kultivierung von <i>Escherichia coli</i> .....	23
2.3.2 Transformation von <i>E. coli</i> .....	23
2.3.2.1 Präparation kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen zur Hitzeschock-Transformation.....	23
2.3.2.2 Transformation .....	24
2.3.3 Plasmid-DNA-Isolierung aus <i>E. coli</i> .....	24
2.3.4 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	24
2.3.4.1 Amplifizierung von <i>ppoC</i> .....	25

2.3.4.2 Gerichtete Punktmutagenese .....	25
2.3.4.3 Kolonie-PCR .....	27
2.3.5 DNA-Sequenzanalyse.....	27
2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	28
2.3.6.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA .....	28
2.3.6.2 Elution von DNA aus Agarosegelen .....	29
2.3.7 Klonierungsmethoden.....	29
2.3.7.1 Ligation mit dem pJET2.1-Vektor-System .....	29
2.3.7.2 Ligation in den Expressionsvektor pET24a .....	30
2.3.7.3 DNA-Restriktion .....	30
2.3.8 Heterologe Expression der rekombinanten Proteine in <i>E. coli</i> .....	31
2.3.9 Zellaufschluss von <i>E. coli</i> -Expressionskulturen.....	32
2.3.10 Proteinreinigung .....	32
2.3.10.1 Source30Q-Anionenaustauscher .....	32
2.3.10.2 Superdex-S200pg-Gelfiltration.....	33
2.3.10.3 MonoQ-Anionenaustauscher .....	33
2.3.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	34
2.3.12 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford .....	35
2.3.13 Bestimmung der Ppo-Aktivität.....	36
2.3.13.1 Umsetzung von Fettsäuren .....	36
2.3.13.2 Inkubation unter <sup>18</sup> O <sub>2</sub> -Atmosphäre .....	36
2.3.13.3 Methylierung von Fettsäuren.....	37
2.3.13.4 Kolorimetrischer Nachweis der Peroxidase Aktivität .....	37
2.3.14 Analyse der Ppo-Produkte .....	37
2.3.14.1 Analyse der Produktbildung mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeits- Chromatographie (RP-HPLC).....	37
2.3.14.2 Analyse der Produktbildung mittels Radio-RP-HPLC.....	38
2.3.14.3 Sterische Analyse mittels Normalphasen-HPLC (SP-HPLC) und Chiralphasen-HPLC (CP-HPLC) .....	38
2.3.14.4 Produktanalyse mittels GC/MS .....	39
2.3.14.5 Produktanalyse mittels RP-HPLC/MS <sup>2</sup> .....	39
2.3.14.6 Abfangen kohlenstoffzentrierter Fettsäure-Radikale mit Hilfe von stabilen Nitroxyl- Radikalen .....	40
2.3.15 Biochemische Charakterisierung an der Sauerstoffelektrode.....	41
2.3.15.1 Herstellung von Natriumfettsäuresalzen .....	41
2.3.15.2 Bestimmung des pH-Optimums und kinetischer Konstanten.....	41
2.3.16 Spektroskopische Analysen .....	42

2.3.16.1 UV/vis Spektroskopie .....	42
2.3.16.2 Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) .....	42
2.3.16.3 Elektron-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) .....	43
2.3.17 Untersuchungen des kinetischen Isotopie-Effekts ( <i>KIE</i> ) .....	44
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
3.1 Domänenstruktur und Aminosäuresequenzvergleiche .....	46
3.2 Biochemische Charakterisierung von PpoA .....	49
3.2.1 Klonierung und Expression von PpoA .....	49
3.2.2 Proteinreinigung .....	50
3.2.3 Molekulare Masse und oligomere Struktur von PpoA .....	52
3.2.4 Spektroskopische Analysen und prosthetische Gruppen .....	53
3.2.4.1 UV/vis-Analyse .....	53
3.2.4.2 ESR-Analyse .....	55
3.2.5 Produktidentifikation .....	56
3.2.5.1 Analyse der gebildeten Produkte mittels Radio-HPLC .....	56
3.2.5.2 Analyse der gebildeten Produkte mittels GC/MS .....	57
3.2.5.3 Analyse der gebildeten Produkte mittels RP-HPLC/MS <sup>2</sup> .....	59
3.2.6 Analyse des Reaktionsmechanismus .....	61
3.2.6.1 Analyse der Produktbildung unter <sup>18</sup> O <sub>2</sub> -Atmosphäre .....	61
3.2.6.2 Analyse der 8-Hydroperoxid-Isomerase-Aktivität .....	62
3.2.6.3 Analysen einer mutmaßlichen Epoxyalkohol-Synthase-Aktivität (EAS) .....	63
3.2.6.4 Abfangen kohlenstoffzentrierter Fettsäure-Radikale mit Hilfe von stabilen Nitroxyl-Radikalen .....	65
3.2.7 Kinetische Analysen .....	67
3.2.7.1 Analyse des pH-Optimums .....	67
3.2.7.1 Analyse kinetischer Parameter .....	68
3.2.8 Analyse der Peroxidase-Aktivität .....	70
3.2.9 Mutagenesestudien an PpoA .....	71
3.2.9.1 Mutagenese katalytisch essentieller Aminosäuren in der Peroxidase- und Cytochrom-P450-Domäne .....	71
3.2.9.1.1 Analyse der Dioxygenase-Aktivität .....	72
3.2.9.1.2 Analysen der 8-Hydroperoxid-Isomerase-Aktivität .....	74
3.2.9.1.3 Kinetische Analysen der Dioxygenase-Aktivität von PpoA_H1004A .....	75
3.2.9.1.4 Spektroskopische Analysen von PpoA_Y374F und PpoA_H1004A .....	76
3.2.9.2 Mutagenese von regiospezifitätsrelevanten Aminosäuren .....	79

3.2.10 Analyse substratinduzierter Proteinradikale.....	81
3.2.11 Untersuchungen des kinetischen Isotopie-Effekts ( <i>KIE</i> ).....	82
<b>3.3 Biochemische Charakterisierung von PpoC.....</b>	<b>85</b>
3.3.1 Klonierung von PpoC.....	85
3.3.2 Proteinreinigung.....	86
3.3.3 Spektrale Analyse.....	86
3.3.4 Analyse der gebildeten Produkte.....	87
3.3.5 Untersuchungen der EAS-Aktivität.....	92
3.3.5.1 Analyse der Epoxyalkoholbildung unter <sup>18</sup> O <sub>2</sub> -Atmosphäre.....	93
3.3.5.2 Analyse der EAS-Aktivität.....	94
3.3.6 Abfangen kohlenstoffzentrierter Fettsäure-Radikale mit Hilfe von stabilen Nitroxyl-Radikalen.....	95
3.3.7 Kinetische Analysen.....	96
3.3.8 Analyse der Peroxidase-Aktivität.....	97
3.3.9 Mutagenesestudien an PpoC.....	97
3.3.9.1 Mutagenese des katalytischen Tyrosins.....	97
3.3.9.2 Mutagenese der mutmaßlichen Cytochrom-P450-Domäne von PpoC.....	98
3.3.9.3 Mutagenese von regiospezifitätsrelevanten Aminosäuren.....	98
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>100</b>
4.1 Biochemische Eigenschaften von PpoA.....	101
4.2 Biochemische Eigenschaften von PpoC im Vergleich zu PpoA.....	108
4.3 Ausblick.....	114
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>116</b>
<b>6. Referenzen.....</b>	<b>117</b>
<b>7. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>128</b>
<b>8. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>130</b>
<b>9. Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>131</b>
<b>10. Anhang.....</b>	<b>135</b>
10.1 <i>cDNA</i> und abgeleitete Proteinsequenzen von PpoA und PpoC.....	135
10.1.1 PpoA (Accessionnr.:AY502073).....	135
10.1.2 PpoC (Accessionnr.: AY613780).....	137

<i>10.2 Primer</i> .....	138
10.2.1 Klonierungs-Primer .....	138
10.2.2 Mutagenese-Primer.....	138

# 1. Einleitung

## 1.1 Fettsäuren und Lipide

Bei Lipiden handelt es sich um Biomoleküle, die in jeder lebenden Zelle vorkommen und dort eine Vielzahl verschiedener Funktionen übernehmen. Sie dienen unter anderem als Brennstoffe und Energiedepots und sind darüber hinaus ein wichtiger Baustein biologischer Membranen, die als Trennschicht zwischen verschiedenen Bereichen einer Zelle dienen oder auch als Begrenzung zwischen dem Zellinnern und dem Zellaußenraum fungieren (Berg *et al.*, 2004). Neben diesen zentralen Rollen besitzen einige Lipide eine besondere Funktion als Signalmoleküle (Xue *et al.*, 2007, Wang *et al.*, 2006). So spielen beispielsweise oxidierte ungesättigte Fettsäuren, die allgemein als Oxylipine bezeichnet werden, eine besondere Rolle im Stoffwechsel von Eukaryoten. Sie bilden eine Gruppe oxidierter Fettsäure-Derivate, die für die intra- und intermolekulare Verständigung von Pflanzen, Tieren und Pilzen bekannt sind (Andreou *et al.*, 2009): In Pflanzen zählen die Fettsäure-Hydro(pero)xide, die abgeleiteten Oxo-, Keto-, Epoxy-Fettsäurederivate sowie Divinylether, Aldehyde und die Pflanzenhormone 12-Oxo-Phytodiensäure (OPDA), Jasmonsäure (JA) und deren Derivate zu den Oxylipinen. Diese Substanzen spielen eine zentrale Rolle bei der Verteidigung vor Pathogenen und Feinden (Signalfunktion, antimikrobielle Funktion, Lipoxidation und hypersensitive Reaktion) sowie bei der Samenentwicklung, Keimung (z.B. Lipidmobilisierung) und dem Wachstum (z.B. Knollenentwicklung, Knöllchenentwicklung und Fruchtreifung). Zudem sind sie für die Weiterleitung der Wundantwort der Pflanze wichtig und regulieren die Bildung von weiteren Phytohormonen (Feussner und Wasternack, 2002).

In Säugetieren stellen Eicosanoide, zu denen die Prostaglandine und Leukotriene gehören, die wichtigste Gruppe von Oxylipinen dar. Diese spielen eine bedeutende Rolle bei Entzündungsprozessen, Schmerzantworten und Fieber (Funk, 2001).

In Pilzen und pilzartigen Organismen übernehmen Oxylipine eine wichtige Kontrollfunktion für die Regulation des Entwicklungszyklus und die Mycotoxinproduktion (Noverr *et al.*, 2002, Tsitsigiannis und Keller, 2007).

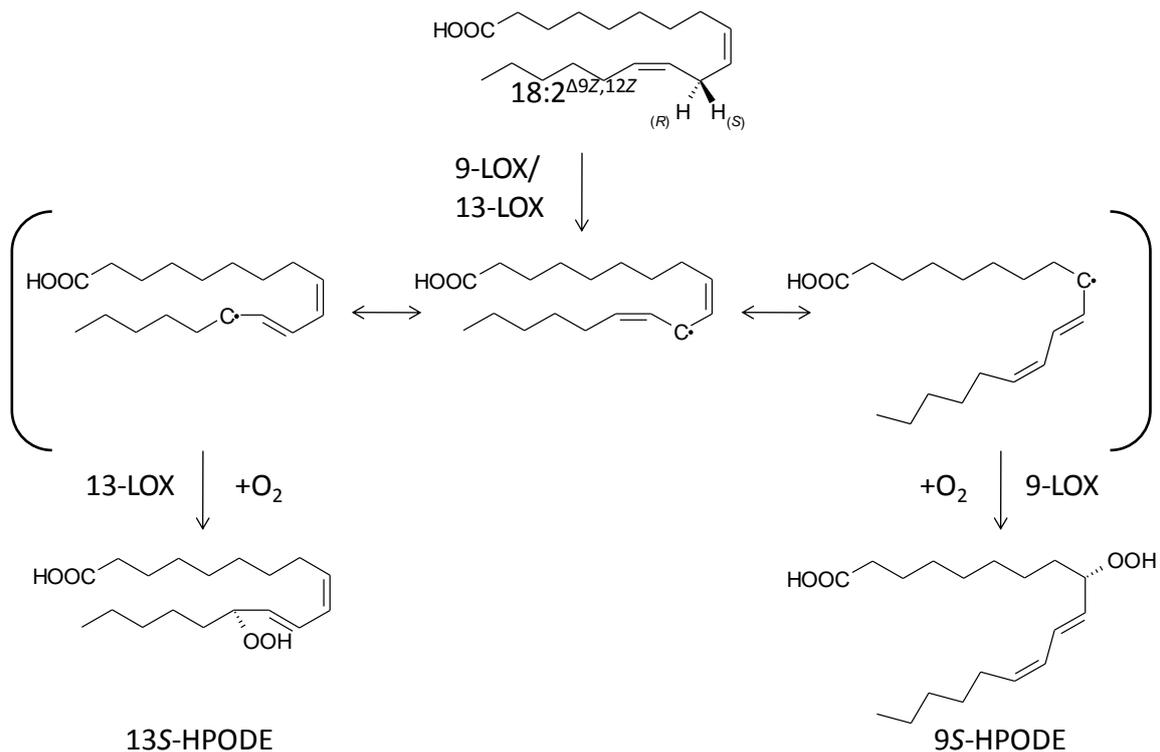
## 1.2 Die Oxylipin-Biosynthese in Pflanzen

In Pflanzen stellt der erste Schritt der Oxylipinbiosynthese meist die Bildung von Fettsäure-Hydroperoxiden dar. Diese Reaktion kann entweder chemisch durch Autooxidation der Fettsäuren stattfinden oder sie erfolgt enzymatisch durch die katalytische Wirkung der Lipoxygenasen (LOX) oder  $\alpha$ -Dioxygenasen ( $\alpha$ -DOX) (Mosblech *et al.*, 2009). Als Substrate für dieser Reaktion dienen vor allem  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$ ,  $18:3^{\Delta 9Z,12Z,15Z}$  und  $16:3^{\Delta 7Z,10Z,13Z}$ , wobei  $x:y^{\Delta z}$  die Fettsäure mit  $x$  Kohlenstoffatomen und  $y$  Doppelbindungen in der Position  $z$  ausgehend vom Carboxylende symbolisiert.

### 1.2.1 Lipoxygenasen

LOX wurden bereits 1932 erstmals von Andre und Hou als Enzyme beschrieben (Andre und Hou, 1932), die die Oxidation von Fettsäuren und den Abbau von Karotinoiden bewirken. Eine Zusammenfassung des Katalysemechanismus erfolgte z.B. 1991 durch Gardner (Gardner, 1991). LOX sind nichthäm-eisenhaltige Dioxygenasen, die aus einer einzelnen Aminosäurekette und zwei verschiedenen Domänen bestehen: der C-terminalen  $\alpha$ -helikalen katalytischen Domäne und der N-terminalen  $\beta$ -Faltblatt-Domäne. Die katalytische Domäne enthält das aktive Zentrum des Enzyms mit der Substratbindungstasche und dem katalytischen Nichthäm-Eisen. Die Funktion der kleineren  $\beta$ -Faltblatt-Domäne hingegen ist noch weitestgehend ungeklärt. Sie ist aber möglicherweise an der Membran- bzw. Substratbindung beteiligt (Liavonchanka und Feussner, 2006).

Für die Umwandlung einer mehrfach ungesättigten Fettsäure zu dem korrespondierenden Hydroperoxy-Derivat spaltet die LOX in einem ersten Reaktionsschritt ein Wasserstoffatom vom bisallylen C-3-Atom der  $1Z,4Z$ -Pentadienyl-Gruppe der Fettsäure ab und ein kohlenstoffzentriertes Radikal wird gebildet. Dieses ist delokalisiert und kann spezifisch zum C-1 oder C-5 verschoben werden, an welchem im folgenden Reaktionsschritt dann der Einbau von molekularem Sauerstoff stets antarafacial erfolgt. Damit ist prinzipiell die Bildung vier verschiedener Produkte möglich, die die eingeführte Hydroperoxy-Gruppe an unterschiedlichen Stellen besitzen. Im Falle von  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  sind das  $9S$  bzw.  $9R$ -Hydroperoxy- $10E,12Z$ -octadecadiensäure ( $9S$ - bzw.  $9R$ -HPODE) oder  $13S$ - bzw.  $13R$ -Hydroperoxy- $9Z,11E$ -octadecadiensäure ( $13S$ - bzw.  $13R$ -HPODE). Pflanzliche LOX werden entsprechend des gebildeten Produktes unterschieden und als linoleat  $9S$ - bzw.  $9R$ -LOX oder linoleat  $13S$ - bzw.  $13R$ -LOX klassifiziert. Die katalysierte Reaktion verläuft daher in der Regel stereospezifisch und es wird von einem Enzym entweder das Hydroperoxy-Derivat in  $S$ - oder in  $R$ -Konfiguration gebildet, wobei  $S$ -spezifische LOX überwiegen (Schneider und Brash, 2002, Schneider *et al.*, 2007). Abb. 1 zeigt den Mechanismus für die Reaktion einer  $9S$ -LOX und einer  $13S$ -LOX am Beispiel der Reaktion mit  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$ .



**Abb.1. Mechanismus der Reaktion einer 9S-LOX bzw. 13S-LOX mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup>.** (modifiziert nach Liavonchanka und Feussner, 2006)

Der initiale Schritt der Reaktion ist die Abspaltung eines Wasserstoffatoms vom C-11 des Fettsäurerückgrats. Im Falle der 13S-LOX wird das proS-Wasserstoffatom abgespalten, während die 9S-LOX das proR-Wasserstoffatom abspaltet. Das entstehende Radikal ist delokalisiert und wird spezifisch zum C-9 bzw. C-13 verschoben; dort wird es stets antarafacial von molekularem Sauerstoff angegriffen und 13S-HPODE bzw. 9S-HPODE wird gebildet. HPODE, Hydroperoxyoctadecadiensäure; LOX, Lipoxygenase.

## 1.2.2 Der Oxylin-Stoffwechselweg in Pflanzen

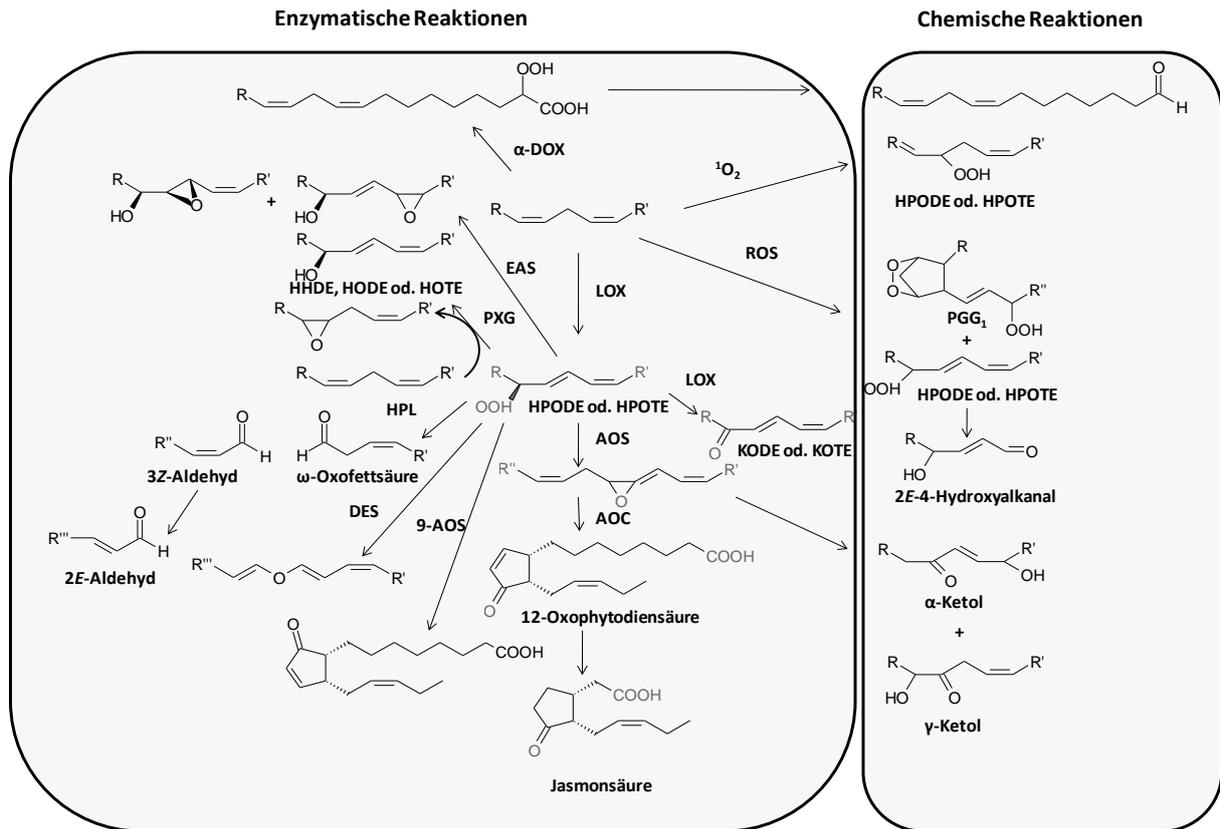
Die durch die LOX gebildeten Hydroperoxy-Fettsäurederivate können durch verschiedene Enzyme, wie z.B. die Allenoxid-Synthase (AOS), Divinylether-Synthase (DES), Hydroperoxid-Lyase (HPL), Peroxygenase (PXG) oder Epoxyalkohol-Synthase (EAS) weiter metabolisiert werden (siehe Abb. 2).

Alternativ können diese Hydroperoxide auch durch chemische Reaktionen umgesetzt werden.

Eine Vielzahl der genannten Enzyme gehört zu der Superfamilie der Cytochrom-P450-Enzyme und bildet hier eine eigene Untergruppe, die CYP74-Enzyme (Stumpe und Feussner, 2006). Zu ihnen gehören die AOS, DES, HPL und wahrscheinlich auch einige EAS (Lee *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu herkömmlichen Cytochrom-P450-Enzymen benötigen diese Enzyme keinen molekularen Sauerstoff und externen Elektronen-Donor (wie z.B. NAD(P)H abhängige Cytochrom-P450-Reduktasen). Das Hydroperoxid dient hier als Substrat und Sauerstoffquelle zugleich. Es handelt sich bei dieser Subfamilie damit nicht wie bei allen anderen P450-Enzymen um Monooxygenasen, sondern um Hydroperoxid-Isomerasen (Stumpe und Feussner, 2006, Lee *et al.*, 2008, Matsui, 2006).

Die membranassoziierte AOS überführt das Hydroperoxy-Fettsäurederivat in ein instabiles Allyl-Fettsäure-Epoxid (Lee *et al.*, 2008) und katalysiert somit den ersten Schritt in der JA-Biosynthese (Wasternack, 2007). Als weiteres Enzym der CYP74-Familie katalysiert die HPL die Spaltung des Hydroperoxy-Fettsäurederivats in eine  $\omega$ -Oxo-Fettsäure und meistens in ein 3Z-Alkanal (Grechkin und Hamberg, 2004). Interessanterweise erscheinen die AOS und HPL für die unterschiedlichen Reaktionen einen verwandten Mechanismus zu verwenden bzw. ähnliche Reaktionsintermediate zu bilden. So konnte beispielsweise kürzlich gezeigt werden, dass eine HPL durch den Austausch einer einzelnen Aminosäure, die wahrscheinlich für die Stabilisierung des Reaktionsintermediats verantwortlich ist, in eine AOS überführt werden kann (Lee *et al.*, 2008). Die DES stellt das dritte Enzym der CYP74-Familie dar und katalysiert die Umwandlung eines Hydroperoxy-Fettsäurederivats zu einem Divinylether (Stumpe *et al.*, 2008). Die Zuordnung der EAS als viertes Mitglied der CYP74-Familie ist seit langer Zeit in Diskussion. Erst kürzlich wurde die erste cDNA einer EAS in marinen Invertebraten als ein CYP74-Enzym identifiziert (Lee *et al.*, 2008). Die EAS katalysiert die Isomerisierung eines Hydroperoxy-Fettsäurederivats zu einem Epoxyalkohol.

Im Gegensatz zu diesen Enzymen gehört die PXG nicht zu den Cytochrom-P450-Enzymen, obwohl sie wie diese auch Häm als Kofaktor besitzt. Die PXG wurde kürzlich als das Lipidkörperprotein Caleosin identifiziert (Hanano *et al.*, 2006). Dieses Enzym kann sowohl den intramolekularen Sauerstofftransfer am Fettsäurehydroperoxid zum Epoxyalkohol wie auch den intermolekularen Sauerstofftransfer katalysieren, der zur Bildung eines Fettsäureepoxids führt (Blée, 1998).



**Abb.2. Überblick über die Oxylin-Biosynthese in Pflanzen.** (modifiziert nach Mosblech *et al.*, 2009)

Die Oxylinbiosynthese beginnt mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Der initiale Schritt ist die enzymatische bzw. chemische Umwandlung dieser Fettsäuren zu Hydroperoxy-Fettsäurederivaten durch die LOX oder  $\alpha$ -DOX bzw. Singulett-Sauerstoff oder andere reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Diese dienen als Substrat für weitere spezifische Enzyme oder chemische Sekundärreaktionen wie dargestellt. LOX, Lipoxygenase; AOS, Allenoxid-Synthase, AOC, Allenoxid-Cyclase; DES, Divinylether-Synthase, HPL, Hydroperoxid-Lyase, EAS, Epoxyalkohol-Synthase, PXG, Peroxygenase; HHDE, Hydroxyhexadecadiensäure; H(P)ODE, Hydro(pero)xy-octadecadiensäure; H(P)OTE, Hydro(pero)xyoctadecatriensäure; KODE, Ketoctadecadiensäure, KOTE, Ketoctadecatriensäure.

### 1.3 Die Oxylin-Biosynthese in Säugetieren

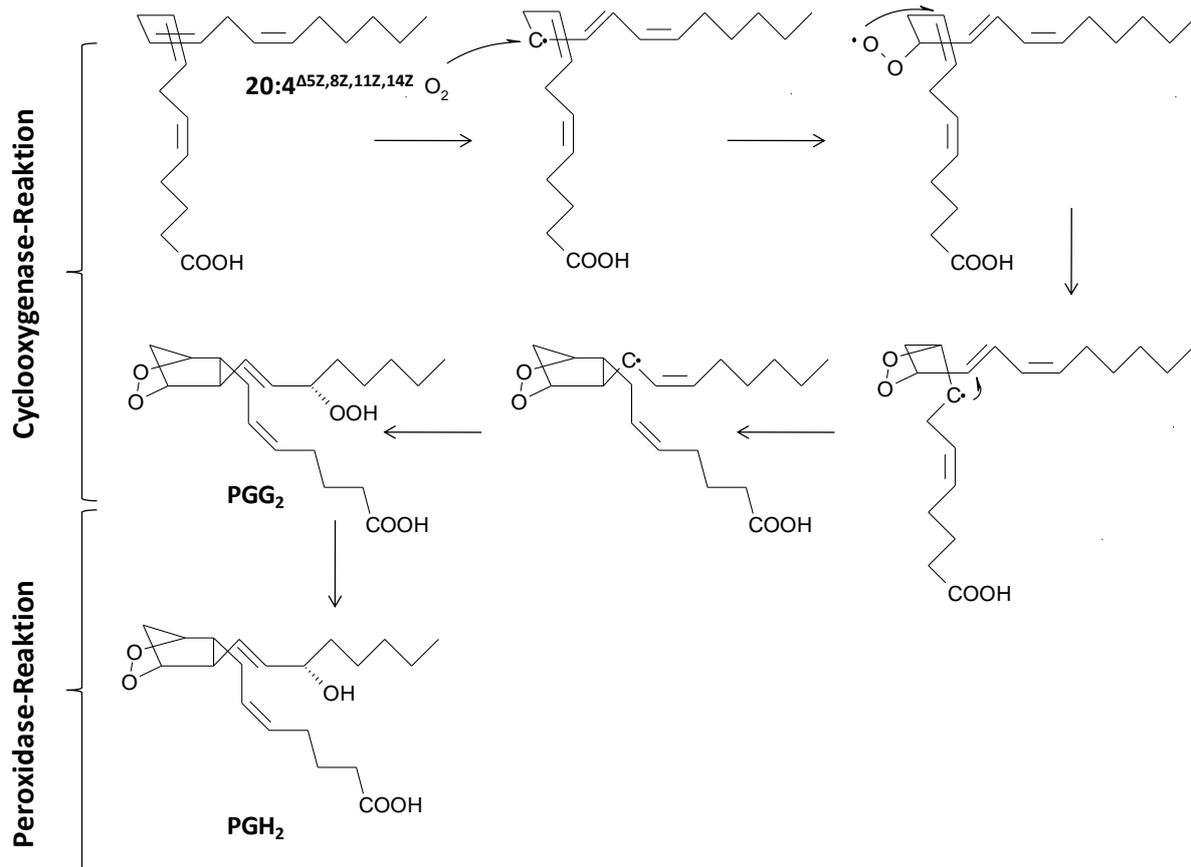
In Tieren und in Pflanzen fungieren vor allem C<sub>18</sub>-Fettsäuren wie z.B. 18:2 <sup>$\Delta$ 9Z,12Z</sup> oder 18:3 <sup>$\Delta$ 9Z,12Z,15Z</sup> als Hauptausgangssubstrate für die Biosynthese von Oxylinen. In Säugetieren werden aber zusätzlich C<sub>20</sub>- und C<sub>22</sub>-Fettsäuren, wie z.B. 20:4 <sup>$\Delta$ 5Z,8Z,11Z,14Z</sup>, 20:3 <sup>$\Delta$ 8Z,11Z,14Z</sup>, 20:5 <sup>$\Delta$ 5Z,8Z,11Z,14Z,17Z</sup> und 22:6 <sup>$\Delta$ 4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z</sup>, als Substrate für die Oxylinbiosynthese verwendet. Vorwiegend wird jedoch 20:4 <sup>$\Delta$ 5Z,8Z,11Z,14Z</sup> als Substrat für die Oxylinbiosynthese verwendet. Dieses kann auf der einen Seite von den unter 1.2.1 beschriebenen LOXen zu 5/12/15-Hydroperoxyeicosatetraensäure (5/12/15-HPETE) oxidiert werden, welche unter anderem eine Vorstufe für die Leukotrien-Biosynthese (siehe 1.3.2) darstellen (Murphy und Gijon, 2007). Auf der anderen Seite dient 20:4 <sup>$\Delta$ 5Z,8Z,11Z,14Z</sup> aber auch als Substrat für eine andere Enzymfamilie – den sogenannten Prostaglandin-H<sub>2</sub>-Synthasen (PGHS) oder

Cyclooxygenasen (COX) (Smith *et al.*, 2000). Diese Enzyme katalysieren den ersten Schritt der Prostaglandin-Biosynthese (vgl. 1.3.2).

### 1.3.1 Prostaglandin-H<sub>2</sub>-Synthasen

Bisher sind zwei PGHS-Isoformen bekannt, die als PGHS-1 und PGHS-2 bezeichnet werden. Bei PGHS-1 handelt es sich um ein konstitutiv exprimiertes Enzym, das für die basale Prostaglandin-Biosynthese verantwortlich ist. Dementgegen wird PGHS-2 vor allem während Entzündungsprozessen exprimiert (Funk, 2001). Beide PGHS-Isoformen sind Homodimere, die aus zwei etwa 70 kDa großen Untereinheiten bestehen. Jede dieser Untereinheiten besitzt nicht kovalent gebundenes Häm als Kofaktor und weist zwei separate katalytische Zentren auf: Der Häm-Kofaktor befindet sich im aktiven Zentrum der Peroxidase-Domäne und dient der katalytischen Peroxidase-Aktivität wie auch der Oxidierung des katalytischen Tyrosin-Rests. Dieser essentielle Aminosäure-Rest befindet sich im katalytischen Zentrum der Cyclooxygenase-Domäne und ist für die Abspaltung eines Wasserstoffatoms vom Fettsäurerückgrat verantwortlich (Smith *et al.*, 2000, Rouzer und Marnett, 2003).

In einem ersten Reaktionsschritt wird das proS-Wasserstoffatom am C-13 des Fettsäurerückgrats von 20:4<sup>Δ5Z,8Z,11Z,14Z</sup> durch das katalytische Tyrosin abgespalten, so dass ein delokalisiertes kohlenstoffzentriertes Radikal entsteht. Dieses wird im folgenden Reaktionsschritt durch den Einbau von molekularem Sauerstoff am C-11 abgefangen, so dass ein 11R-Peroxy-Radikal entsteht. Dieses wiederum bildet anschließend durch eine 5-Exo-Zyklisierung ein zyklisches Fettsäureendoperoxid mit einem kohlenstoffzentrierten Radikal am C-8. Durch eine weitere 5-Exo-Zyklisierung wird ein bizyklisches Endoperoxid und ein allylisches Radikal gebildet, das die höchste Elektronendichte am C-13 und C-15 besitzt. Durch den weiteren Einbau eines zweiten Sauerstoffmoleküls wird dieses am C-15 abgefangen und es entsteht an diesem C-Atom ein Peroxy-Radikal. Dieses wird schließlich zum Hydroperoxid reduziert und das Endprodukt der Cyclooxygenase-Reaktion, Prostaglandin-G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>), wird gebildet (siehe Abb. 3). In der folgenden Peroxidase-Reaktion wird PGG<sub>2</sub> zu Prostaglandin-H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) reduziert. Hierdurch wird das Häm-Eisen (= Protoporphyrin IX Fe<sup>3+</sup> = (PPIX)Fe<sup>3+</sup>) des nativen Enzyms, das sich in der Oxidationsstufe III befindet ((PPIX)Fe<sup>3+</sup>), zu einem Oxo-Eisen-Porphyrin-Radikal-Kation oxidiert, das als *Compound I* (Fe<sup>4+</sup>O(PPIX\*)<sup>+</sup>) bezeichnet wird. Durch eine Ein-Elektron-Reduktion wird das Oxo-Eisen-Porphyrin-Kation gebildet, das als *Compound II* (Fe<sup>4+</sup>O(PPIX)) bezeichnet wird (siehe Abb. 4). Durch eine weitere Ein-Elektron-Reduktion wird schließlich wieder das native Enzym gebildet (Smith *et al.*, 2000, Rouzer und Marnett, 2003).

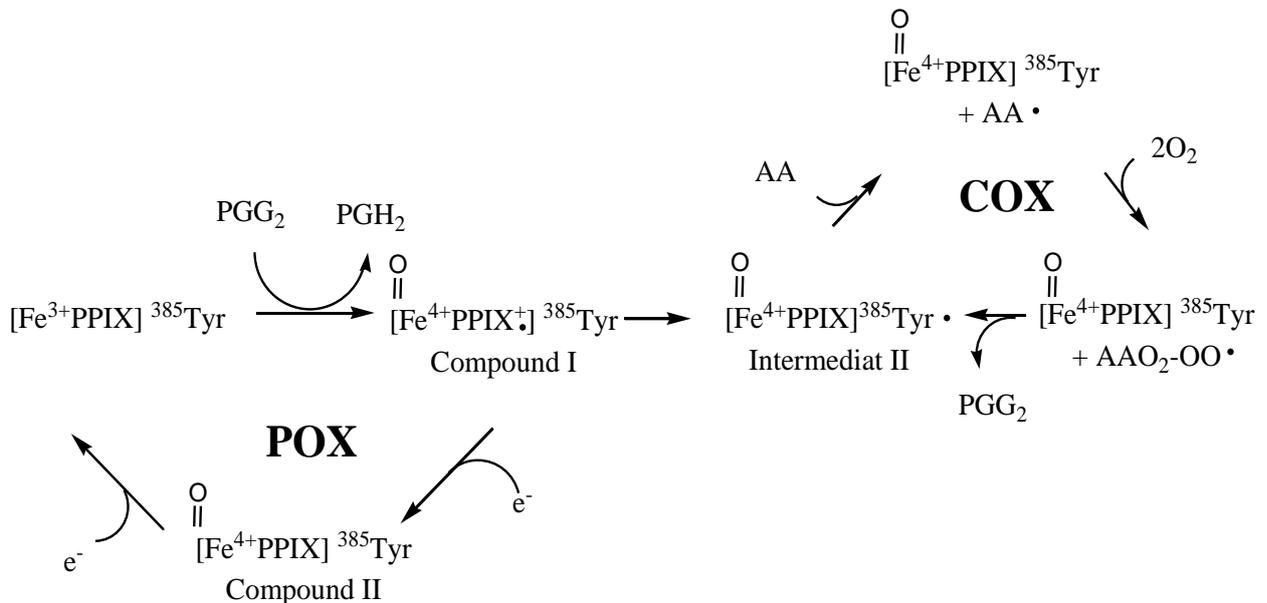


**Abb.3. Detaillierter Mechanismus der Reaktion der PGHS mit 20:4 $\Delta^{5Z,8Z,11Z,14Z}$ .** (modifiziert nach Rouzer und Marnett, 2003)

Für ein leichteres Verständnis ist die Fettsäure in einer „L-Form“ dargestellt. Der erste Schritt der Cyclooxygenase-Reaktion ist die Abspaltung des pro-S-Wasserstoffatoms am C-13 des Fettsäurerückgrats. Es folgt der Einbau von zwei Molekülen Sauerstoff und die Ausbildung eines zyklischen Peroxidringes, das zur Bildung von  $PGG_2$  führt. In der Peroxidase-Reaktion wird  $PGG_2$  zu  $PGH_2$  reduziert.  $PGG_2$ , Prostaglandin-G<sub>2</sub>;  $PGH_2$ , Prostaglandin-H<sub>2</sub>.

Obwohl die Cyclooxygenase- und die Peroxidase-Reaktion an unterschiedlichen aktiven Zentren im Enzym ablaufen, sind die beiden Aktivitäten funktionell gekoppelt. Die Cyclooxygenase-Reaktion ist von der Peroxidase-Reaktion abhängig und setzt eine Zwei-Elektronen-Oxidation der Häm-Gruppe voraus. Dementgegen kann die Peroxidase-Aktivität unabhängig von der Cyclooxygenase-Reaktion ablaufen (Smith *et al.*, 2000). Ein Modell, das diese Kopplung der beiden Aktivitäten berücksichtigt und zu einem Mechanismus vereint, ist der sogenannte *branched chain*-Mechanismus, der zuerst von Ruf und Mitarbeitern vorgeschlagen wurde (Dietz *et al.*, 1988). In einem ersten Schritt muss die Häm-Gruppe durch ein Peroxy-Derivat aktiviert und zu dem oben bereits erwähnten *Compound I* oxidiert werden. *In vitro* handelt es sich bei den aktivierenden Hydroperoxy-Derivaten um Verunreinigungen in kommerziellen Fettsäuren, die einige PGHS-Moleküle aktivieren. Welche Substanz *in vivo* für die Aktivierung der PGHS verantwortlich ist, ist bisher nicht bekannt. Es wird aber angenommen, dass es sich hierbei um Peroxynitrit handeln könnte (Marnett *et al.*, 1999). Das im ersten Schritt gebildete *Compound I* wird anschließend in einem zweiten Schritt durch einen intramolekularen

Elektronentransfer vom katalytischen Tyrosin (Tyr-385 in *O. aries* PGHS-1) zum Protoporphyrin zu dem sogenannten Intermediat II umgewandelt. Wie bereits oben im Kontext der Peroxidase-Reaktion beschrieben, kann *Compound I* auch alternativ durch eine Ein-Elektron-Reduktion zu *Compound II* reduziert werden (Smith *et al.*, 2000). Das im Intermediat II gebildete Tyrosyl-Radikal kann im Folgenden unabhängig von der Peroxidase-Aktivität agieren und die Cyclooxygenase-Reaktion, wie oben beschrieben, initiieren (siehe Abb. 4).



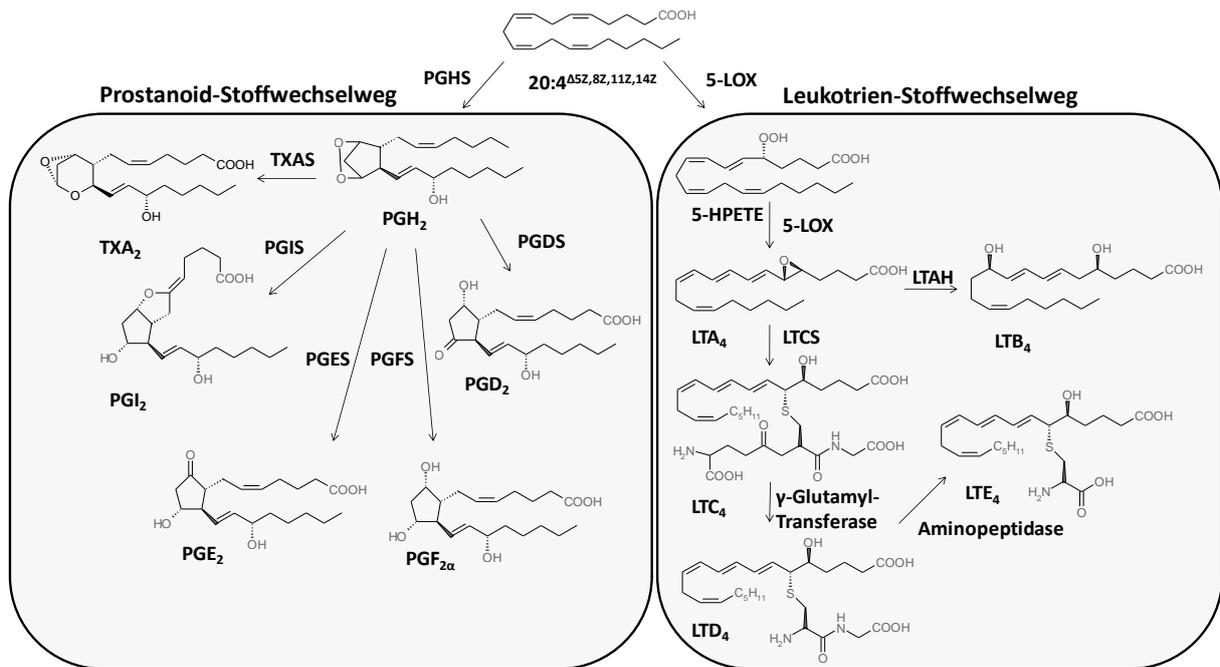
**Abb.4. Branched chain-Mechanismus der PGHS am Beispiel der Reaktion der *O. aries* PGHS-1 mit 20:4<sup>Δ5Z,8Z,11Z,14Z</sup>.** (modifiziert nach Smith *et al.*, 2000)

Die PGHS-1 wird über die Reduktion eines Hydroperoxy-Derivats zum korrespondierenden Alkohol durch die Peroxidase-Aktivität (POX) aktiviert und *Compound I* wird gebildet. Durch einen intramolekularen Transfer eines Elektrons vom katalytischen Tyrosin (Tyr-385) zum Protoporphyrin wird das *Compound I* zu Intermediat II umgewandelt und ein Tyrosyl-Radikal entsteht. Dieses spaltet in der Cyclooxygenase-Reaktion (COX) das proS-Wasserstoff vom C-13 der 20:4<sup>Δ5Z,8Z,11Z,14Z</sup> ab und zwei Sauerstoffmoleküle werden eingebaut. Das intermediär gebildete Fettsäureperoxyl-Radikal wird in einem letzten Schritt zum Fettsäurehydroperoxid reduziert indem ein neues Tyrosyl-Radikal gebildet wird. Das so gebildete Prostaglandin-G<sub>2</sub> kann anschließend in der Peroxidase-Reaktion zu Prostaglandin-H<sub>2</sub> reduziert werden, so dass ein neues *Compound I* entsteht. Dieses wird entweder zum Intermediat II umgewandelt oder durch eine Ein-Elektron-Reduktion zu *Compound II* reduziert. Letzteres kann durch eine weitere Ein-Elektron-Reduktion wieder in den Grundzustand überführt werden. PPIX, Protoporphyrin IX; POX, Peroxidase; COX, Cyclooxygenase; PGG<sub>2</sub>, Prostaglandin-G<sub>2</sub>; PGH<sub>2</sub>, Prostaglandin-H<sub>2</sub>; AA, 20:4<sup>Δ5Z,8Z,11Z,14Z</sup>.

### 1.3.2 Der Prostaglandin- und Leukotrien-Stoffwechselweg in Säugetieren

Der erste Schritt in der Leukotrien-Biosynthese ist die Oxidation von 20:4<sup>Δ5Z,8Z,11Z,14Z</sup> zu 5-Hydroperoxy-6E,8Z,11Z,14Z-eicosatetraensäure (5-HPETE) durch eine arachidonat 5-LOX. Dieses Produkt wird entweder zu dem korrespondierenden Hydroxy-Derivat reduziert oder durch eine weitere Reaktion mit einer 5-LOX zu dem Leukotrien-A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) umgewandelt. Dieses dient als Substrat für LTA<sub>4</sub>-Hydrolase (LTAH), die durch eine Hydroxylierungs-Reaktion aus LTA<sub>4</sub> das Leukotrien-B<sub>4</sub>

(LTB<sub>4</sub>) bildet. Alternativ kann LTA<sub>4</sub> auch als Substrat für die LTC<sub>4</sub>-Synthase (LTCS) fungieren. Dieses Enzym bildet aus LTA<sub>4</sub>, durch den Einbau eines Gly-Cys-Glu-Tripeptids, Leukotrien-C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>). Durch eine folgende Reaktion mit der  $\gamma$ -Glutamyl-Transferase wird der Glutamat-Rest vom LTC<sub>4</sub> entfernt und Leukotrien-D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) gebildet. In einem weiteren Schritt wird durch eine Dipeptidase der Glycin-Rest entfernt und Leukotrien-E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>) gebildet (siehe Abb. 5). LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> und LTE<sub>4</sub> werden als Cysteinyl-Leukotriene bezeichnet (Murphy und Gijon, 2007, Noverr *et al.*, 2003). 20:4 <sup>$\Delta^{5Z,8Z,11Z,14Z}$</sup>  kann auch als Substrat für andere LOXen, wie die arachidonat 12-LOX oder 15-LOX, dienen, die 12-HPETE bzw. 15-HPETE bilden (Brash *et al.*, 1997, Murray und Brash, 1988, Schneider *et al.*, 2001). 20:4 <sup>$\Delta^{5Z,8Z,11Z,14Z}$</sup>  stellt außerdem den Ausgangspunkt für die Prostanoid-Biosynthese dar. Diese biologisch aktiven Substanzen, zu denen die Prostaglandine und Thromboxane zählen, werden von dem durch die PGHS gebildeten PGH<sub>2</sub> ausgehend gebildet. PGH<sub>2</sub> dient somit als Substrat für eine Vielzahl von verschiedenen Reaktionen: So kann es entweder von der Prostacyclin-Synthase (PGIS) zu Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>) oder von der antagonistisch agierenden Thromboxan-Synthase (TXAS) zu Thromboxan-A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) isomerisiert werden. Ähnlich wie bei den bereits oben unter 1.2.2 erwähnten AOS, HPL und DES handelt es sich bei diesen beiden Enzymen um Cytochrom-P450-Enzyme, die keine Monooxygenase-Reaktion katalysieren, sondern eine Isomerisierung eines Endoperoxy-Fettsäurederivats (Haurand und Ullrich, 1985, Hecker und Ullrich, 1989, Wada *et al.*, 2004). Wie bereits für die CYP74-Enzyme beschrieben, benötigen die PGIS und TXAS ebenfalls weder molekularen Sauerstoff noch einen externen Elektronen-Donor wie z.B. die Cytochrom-P450-Reduktase. Außerdem kann PGH<sub>2</sub>, durch die Prostaglandin-D-Synthase (PGDS), Prostaglandin-E-Synthase (PGES) bzw. Prostaglandin-F-Synthase (PGFS) zu Prostaglandin-D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), Prostaglandin-E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) bzw. Prostaglandin-F<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ) umgesetzt werden (siehe Abb. 5).



**Abb.5. Überblick über die Prostanoid- und Leukotrien-Biosynthese in Säugetieren.** (modifiziert nach Noverr *et al.*, 2003)

Die Prostanoid-Biosynthese beginnt mit der Bildung von  $\text{PGH}_2$  aus  $20:4^{\Delta 5Z,8Z,11Z,14Z}$  durch eine PGHS.  $\text{PGH}_2$  dient als Substrat für verschiedene andere Enzyme, wie dargestellt. Die Leukotrien-Biosynthese beginnt mit der Oxidation der  $20:4^{\Delta 5Z,8Z,11Z,14Z}$  zu 5-HPETE durch eine 5-LOX. Dieses wird in einer weiteren Reaktion mit der 5-LOX zu  $\text{LTA}_4$  umgewandelt.  $\text{LTA}_4$  dient als Substrat für verschiedene Enzyme, wie dargestellt.

PGHS, Prostaglandin- $\text{H}_2$ -Synthase; PGIS, Prostacyclin-Synthase; PGES, Prostaglandin- $\text{E}_2$ -Synthase; PGFS, Prostaglandin- $\text{F}_{2\alpha}$ -Synthase;  $\text{PGD}_2$ , Prostaglandin- $\text{D}_2$ -Synthase; TXAS Thromboxan- $\text{A}_2$ -Synthase 5-LOX, 5-Lipoxygenase; LTCS, Leukotrien- $\text{C}_4$ -Synthase; LTAH, Leukotrien- $\text{A}_4$ -Hydrolase;  $\text{PGH}_2$ , Prostaglandin- $\text{H}_2$ ;  $\text{PGD}_2$ , Prostaglandin- $\text{D}_2$ ;  $\text{PGE}_2$ , Prostaglandin- $\text{E}_2$ ;  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , Prostaglandin- $\text{F}_{2\alpha}$ ;  $\text{LTA}_4$ , Leukotrien- $\text{A}_4$ ;  $\text{LTB}_4$ , Leukotrien- $\text{B}_4$ ;  $\text{LTC}_4$ , Leukotrien- $\text{C}_4$ ;  $\text{LTD}_4$ , Leukotrien- $\text{D}_4$ ;  $\text{LTE}_4$ , Leukotrien- $\text{E}_4$ .

## 1.4 Die Oxylipin-Biosynthese in Pilzen

Die Biosynthese von Oxylipinen in Pilzen ist seit nun mehr als drei Jahrzehnten Gegenstand der Forschung und dennoch ist ihre Funktion nicht eingehend bekannt. Auch die Synthese von Oxylipinen in Pilzen, vor allem die daran beteiligten Enzyme, ist bisher wenig erforscht. Einzig für den Modellorganismus *A. nidulans* konnte bisher gezeigt werden, dass Oxylipine für diesen Pilz von physiologischer Relevanz sind (Tsitsigiannis und Keller, 2007).

### 1.4.1 Prostaglandine in Pilzen

Für mehrere pathogene und nicht pathogene Pilze ist die Bildung von Prostaglandinen, wie in 1.3 für Säugetiere beschrieben, beobachtet worden. So konnte beispielsweise für die pathogene Hefe *Candida albicans* und *Cryptococcus neoformans* gezeigt werden, dass hier Prostaglandine *de novo* synthetisiert

oder aber auch durch exogen zugegebenes  $20:4^{\Delta 5Z,8Z,11Z,14Z}$  gebildet werden können (Noverr *et al.*, 2001, Noverr *et al.*, 2002). Für *Mortierella* und *Cunninghamella* konnte zudem die Bildung von  $\text{PGE}_2$  und  $\text{PGF}_{2\alpha}$  beobachtet werden, während in *Saccharomyces cerevisiae*  $\text{PGF}_2$  und  $\text{PGF}_2$ -Lakton nachgewiesen werden konnten (Lamacka und Sajbidor, 1998). Die Identifikation der für die Prostaglandin-Synthese verantwortlichen Enzyme hat sich bisher als schwer erwiesen. So konnten über Sequenzanalysen der pilzlichen Genome keine Enzyme identifiziert werden, die eine signifikante Homologie zu den bisher bekannten PGHS besitzen. Eine weitere bisher ungeklärte Frage stellt in diesem Kontext die Substratzugänglichkeit für die Prostaglandin-Synthese dar. So konnten in pilzlichen Organismen bisher nur äußerst geringe Mengen an  $\text{C}_{20}$ -Fettsäuren nachgewiesen werden, die für die Prostaglandinsynthese notwendig sind. Für pathogene Pilze wird angenommen, dass diese  $20:4^{\Delta 5Z,8Z,11Z,14Z}$  als Substrat verwenden, welches während der Infektion von dem Wirt abgesondert wird (Erb-Downward und Noverr, 2007).

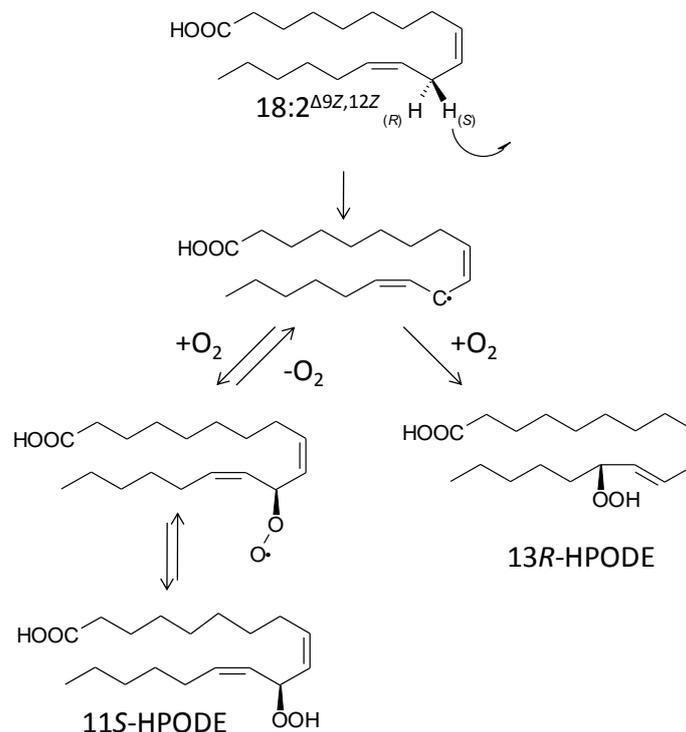
Die Funktion der Prostaglandine in Pilzen ist bisher nicht eindeutig geklärt. Es wird aber angenommen, dass sie eine wichtige Rolle bei dem Wachstum und der Reifung des Pilzes spielen. Außerdem scheinen sie für Infektionsprozesse eine hohe Bedeutung zu besitzen (Noverr *et al.*, 2001, Noverr *et al.*, 2003, Alem und Douglas, 2004).

## 1.4.2 LOXen und LOX-Produkte in Pilzen

Die erste pilzliche LOX wurde 1975 in *Fusarium oxysporum* entdeckt. Dieses sehr kleine Enzym mit einer molekularen Masse von 12 kDa wird durch  $\text{Co}^{2+}$  stabilisiert und zeigte eine enzymatische Aktivität bis zu 70 °C. Es wurde gezeigt, dass die LOX eine katalytische Aktivität mit  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  besitzt und diese Fettsäure zu einer Mischung aus 9- und 13-Hydroperoxy-Fettsäurederivaten oxidiert (Matsuda *et al.*, 1976, Matsuda *et al.*, 1978a, Matsuda *et al.*, 1978b, Matsuda *et al.*, 1979). Später wurde außerdem eine LOX in *Saprolegnia parasitica* beschrieben und als 15-LOX identifiziert. Interessanterweise scheint dieses 145 kDa große Enzym eine duale Aktivität aufzuweisen. So zeigte es neben der Dioxygenase-Aktivität außerdem noch eine EAS-Aktivität und konnte 15-HPETE in zwei Epoxyalkohole isomerisieren: 11S,12R-Epoxy-15S-hydroxy-5Z,8Z,13E-eicosatriensäure und 13R,14R-Epoxy-15S-hydroperoxy-5Z,8Z,11Z-eicosatriensäure (Hamberg, 1986, Hamberg, 1995, Herman und Hamberg, 1987). Weiterhin wurde eine thermostabile 13-LOX in dem thermophilen Organismus *Thermomyces lanuginosus* (Li *et al.*, 2001) und außerdem in *Pleurotus ostreatus* (Kuribayashi *et al.*, 2002) nachgewiesen. Letztere zeigte eine hohe enzymatische Aktivität auch bei niedrigen Temperaturen. Es wird angenommen, dass diese LOX eine wichtige Rolle in der frühen Entwicklungsphase des Pilzes spielt, welche normalerweise durch niedrige Temperaturen eingeleitet wird. Auch in dem essbaren Trüffelpilz *Terfezia clavaryi* konnte eine LOX nachgewiesen werden; von

dieser wird vermutet, dass sie für dessen ranzigen Geschmack bei längerer Lagerung des Trüffels verantwortlich ist (Perez-Gilabert *et al.*, 2005).

Die wohl bisher am besten charakterisierte pilzliche LOX ist die Mangan-Lipoxygenase (MnLOX) aus *Gaeumannomyces graminis* (Su und Oliw, 1998, Hamberg *et al.*, 1998, Hörnsten *et al.*, 2002). Dieses Enzym unterscheidet sich von allen bisher beschriebenen LOXen darin, dass diese LOX nicht Eisen als katalytisches Metall verwendet, sondern Mangan. ESR-Analysen zeigten, dass das native Enzym  $Mn^{2+}$  enthält, während das aktive Enzym  $Mn^{3+}$  für die katalytische Aktivität benötigt (Su *et al.*, 2000). Die Verwendung von Mangan an Stelle von Eisen hat einen erheblichen Einfluss auf den Reaktionsmechanismus des Enzyms wie auch auf die gebildeten Produkte. Der erste Reaktionsschritt stellt die Abspaltung des proS-Wasserstoffatoms vom bisallylen Kohlenstoff des 1Z,4Z-Pentadiensystems der  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  dar, der zur Bildung eines kohlenstoffzentrierten Radikals führt. Dieser Schritt entspricht dem ersten Reaktionsschritt eisenhaltiger Enzyme. Doch während eisenhaltige LOXen den Sauerstoff antarafacial entweder am C-9 oder C-13 von  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  einbauen und so entweder das 9-Hydroperoxy- oder das 13-Hydroperoxy-Derivat bilden (siehe Abb. 1), kann die MnLOX Sauerstoff reversibel am C-11 suprafacial einbauen, so dass 11S-HPODE entstehen kann (siehe Abb. 6). Zusätzlich kann der Sauerstoffeinbau auch irreversibel und suprafacial am C-13 erfolgen, so dass 13R-HPODE entsteht (Hamberg *et al.*, 1998).



**Abb.6. Reaktionsmechanismus der MnLOX aus *G. graminis*.** (modifiziert nach Hamberg *et al.*, 1998)

Im ersten Reaktionsschritt wird das proS-Wasserstoffatom am C-11 der  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  abgespalten und ein kohlenstoffzentriertes Radikal wird gebildet. Sauerstoff greift dieses suprafacial an und 11S-HPODE wird gebildet, welches zu 13R-HPODE isomerisiert werden kann. Alternativ kann Sauerstoff auch am C-13 irreversibel und suprafacial eingebaut werden, so dass 13R-HPODE entsteht. HPODE, Hydroperoxy-octadecadiensäure.

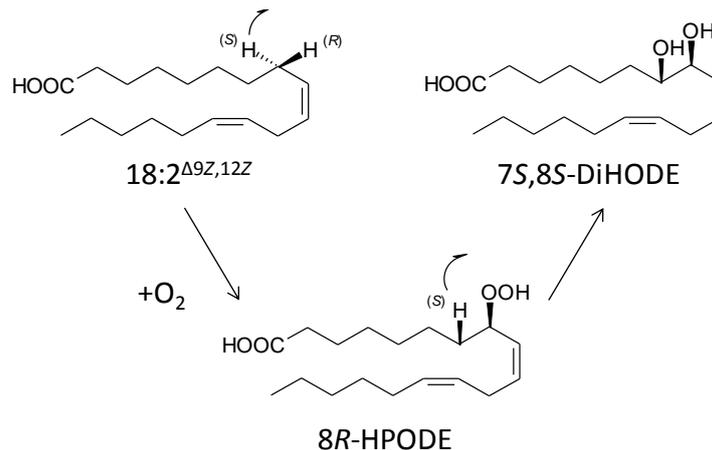
Interessanterweise konnten über Mutagenesestudien neben den Mangan-Liganden (Cristea *et al.*, 2005) auch ein Glycin-Rest identifiziert werden, der essentiell für die katalytische Aktivität der LOX ist (Cristea und Oliw, 2006). Dieses Glycin ist in fast allen *R*-spezifischen LOXen konserviert, während *S*-spezifische LOXen an dieser Position ein Alanin besitzen (Coffa und Brash, 2004, Coffa *et al.*, 2005, Andreou *et al.*, 2008, Boeglin *et al.*, 2008). Außerdem ist dieser Aminosäurerest an der Positionierung der Fettsäure im aktiven Zentrum beteiligt und beeinflusst die Stelle des Sauerstoffeinbaus (Schneider *et al.*, 2007). Der Austausch dieses Glycins durch Alanin verschob nicht nur die Position des Sauerstoffeinbaus vom C-13 zum C-11 und C-9, sondern führte auch zu einer zusätzlichen EAS-Aktivität des Enzyms (Cristea und Oliw, 2006).

Die biologische Funktion der MnLOX ist bisher noch unbekannt. Es wird aber diskutiert, dass die durch sie gebildeten Oxylipine zu einer oxidativen Schädigung der Weizenwurzeln führen, wenn diese durch *G. graminis* infiziert sind (Oliw, 2002). Außerdem ist es möglich, dass die pilzlichen Oxylipine den programmierten Zelltod induzieren, wie es ebenfalls für pflanzliche Oxylipine angenommen wird (Montillet *et al.*, 2005). Es konnte zudem beobachtet werden, dass LOX-Produkte auch für den Bestand dichte-abhängiger Übergänge bei dimorphen Pilzen von Bedeutung sind. So wird angenommen, dass diese eine wichtige Rolle beim *quorum sensing* spielen (Jensen *et al.*, 1992, Horowitz Brown *et al.*, 2008). Hierunter versteht man einen Prozess, in dem viele einzelne Zellen sich und ihr Verhalten so koordinieren, dass sie zusammen wie ein vielzelliger Organismus agieren können.

### 1.4.3 Linoleat-Diol-Synthasen (7,8-LDS)

Im Jahr 1986 wurde das erste Oxylipin identifiziert, das weder mit den bisher bekannten Prostaglandinen noch mit den LOX-Produkten eine besondere Ähnlichkeit aufwies. Dieses Oxylipin wurde als 8*R*-HODE identifiziert und da es zunächst nur in *Laetisaria arvalis* beobachtet wurde, als *laetisaric acid* bezeichnet (Bowers *et al.*, 1986). Spätere Studien zeigten jedoch, dass dieses Oxylipin auch in *A. nidulans*, *Magnaporthe grisea* und *G. graminis* gebildet wird (Champe und el-Zayat, 1989, Mazur *et al.*, 1990, Mazur *et al.*, 1991, Cristea *et al.*, 2003). In letzteren wurde zusätzlich die Synthese von 7*S*,8*S*-DiHODE von 18:2<sup>Δ<sup>9Z</sup>,12Z</sup> ausgehend beobachtet (Brodowsky *et al.*, 1992, Brodowsky und Oliw, 1992, Hamberg *et al.*, 1994), während in *A. nidulans* zwei weitere Oxylipine, 5,8-DiHODE und das Lakton dieser Verbindung identifiziert wurden (Champe und el-Zayat, 1989, Champe *et al.*, 1987). Das für die Synthese von 7*S*,8*S*-DiHODE verantwortliche Enzym wurde kurze Zeit später identifiziert und als 7,8-LDS bezeichnet. Innerhalb der letzten 10-15 Jahre wurde dieses Enzym eingehend untersucht und charakterisiert (Su *et al.*, 1995, Su und Oliw, 1996, Su *et al.*, 1998, Oliw *et al.*, 1999, Garscha und Oliw, 2008a, Garscha und Oliw, 2008b). Es zeigte sich, dass es sich

um ein homotetrameres Häm-Protein handelt, das zwei unterschiedliche katalytische Aktivitäten besitzt (Su und Oliw, 1996, Su *et al.*, 1998). In einem ersten Reaktionsschritt wird das pro-S-Wasserstoffatom am C-8 der 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> abgespalten und Sauerstoff wird antarafacial eingebaut (Hamberg *et al.*, 1994), so dass 8R-HPODE entsteht. Dieses intermediär gebildete Zwischenprodukt wird anschließend in einem zweiten Reaktionsschritt zu 7S,8S-DiHODE isomerisiert (siehe Abb. 7), wobei der intramolekulare Sauerstoffeinbau suprafacial erfolgt (Brodowsky *et al.*, 1992, Hamberg *et al.*, 1994).



**Abb.7. Reaktionsmechanismus der 7,8-LDS aus *G. graminis*.** (modifiziert nach Su *et al.*, 1998)

Die 7,8-LDS ist ein bifunktionales Enzym, das in einem ersten Reaktionsschritt das pro-S-Wasserstoffatom am C-8 der 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> abspalten und an dieser Position molekularen Sauerstoff antarafacial einbaut. Das so intermediär gebildete 8R-HPODE wird anschließend in einem zweiten Reaktionsschritt zu 7S,8S-DiHODE isomerisiert, wobei der Sauerstoffeinbau am C-7 suprafacial erfolgt. LDS, Linoleat-Diol-Synthase; HPODE, Hydroperoxyoctadecadiensäure; DiHODE, Dihydroxyoctadecadiensäure.

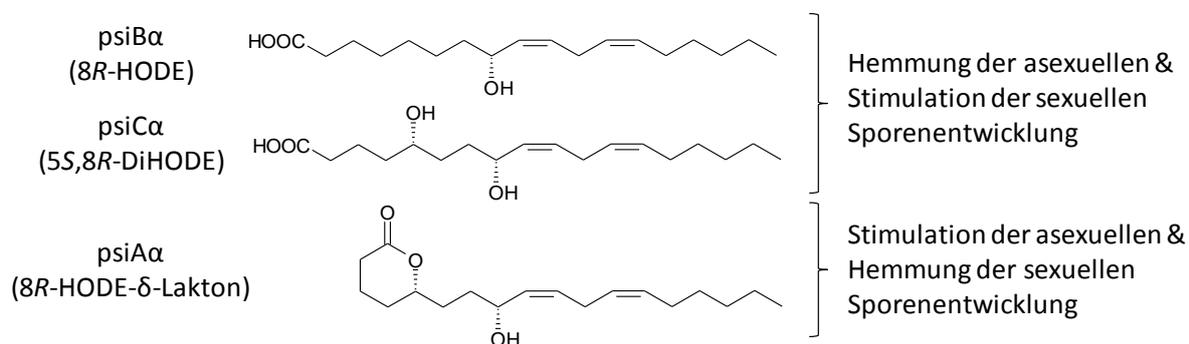
Weitere Untersuchungen des Reaktionsmechanismus führten zu der Hypothese, dass dieses Enzym einen ähnlichen Katalysemechanismus verwenden könnte wie die bereits bekannte PGHS (Su *et al.*, 1998). Tatsächlich zeigte die später isolierte cDNA, dass die Aminosäuresequenz der 7,8-LDS eine Identität von 23-24 % zu der PGHS-Aminosäuresequenz aufweist (Hörnsten *et al.*, 1999). Auf der Homologie zu PGHS basierend konnten die Häm-Liganden und das essentielle Tyrosin in der 7,8-LDS identifiziert werden. Spätere Mutagenese-Studien unterstützen die Hypothese einer strukturellen Verwandtschaft zur PGHS (Garscha und Oliw, 2008a, Garscha und Oliw, 2008b).

Obwohl die Aktivität der 7,8-LDS in den letzten Jahren eingehend untersucht wurde, gibt es bisher keine *in vivo* Studien über die Funktion dieses Enzyms in *G. graminis*. Somit bleibt die physiologische Relevanz dieses Enzyms bis heute unbekannt. Interessanterweise konnte aber in *Cercospora zeae-maydis* ein Gen mit signifikanter Homologie zur 7,8-LDS identifiziert werden, welches unter Bedingungen exprimiert wird, die normalerweise die Bildung des Mycotoxins Cercosporin induziert (Shim und Dunkle, 2002). So kann angenommen werden, dass die 7,8-LDS evtl. eine Rolle für die Pathogenität des Pilzes spielt. Weiterhin wurde kürzlich ein Protein aus *Ustilago maydis* isoliert, das

als Ssp1 (engl. *spore specific protein 1*) bezeichnet wird und eine 33 %ige Identität zur 7,8-LDS besitzt. Dieses Enzym wird in reifen Teliosporen exprimiert und ist an spherischen Organellen lokalisiert, bei denen es sich wahrscheinlich um Lipidkörper handelt (Huber *et al.*, 2002). Kürzlich konnte zudem eine 7,8-LDS in dem Pilz *M. grisea* identifiziert werden (Cristea *et al.*, 2003).

### 1.4.4 Psi-Faktoren in *A. nidulans*

Ende der 1980iger Jahre wurden die ersten Oxylipine in *A. nidulans* nachgewiesen. So konnte das bereits oben erwähnte 8*R*-HODE (*laetisarinic acid*) wie auch weitere 8-Hydroxy-Fettsäurederivate von 18:1<sup>Δ9Z</sup> und 18:3<sup>Δ9Z,12Z,15Z</sup> aus dem Pilz isoliert werden. Außerdem wurden 5,8-Dihydroxy-Derivate und 8-Hydroxy-δ-Lakton-Derivate von 18:1<sup>Δ9Z</sup>, 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> und 18:3<sup>Δ9Z,12Z,15Z</sup> in dem Pilz nachgewiesen (Champe *et al.*, 1987, Champe und el-Zayat, 1989, Mazur *et al.*, 1990, Mazur *et al.*, 1991). Diese frühen Studien zeigten bereits, dass diese Oxylipin-Derivate die asexuelle und sexuelle Sporenentwicklung des Pilzes beeinflussen. Auf dieser Eigenschaft basierend wurden sie als *precocious sexual inducer* oder kurz als Psi-Faktoren bezeichnet. Psi-Faktoren werden in verschiedene Klassen unterteilt und dementsprechend benannt: Psi-Faktoren, die sich von der 18:1<sup>Δ9Z</sup>, 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> oder 18:3<sup>Δ9Z,12Z,15Z</sup> ableiten, werden als psiβ, psiα bzw. psiγ bezeichnet. Außerdem werden sie durch die Anzahl und die Positionen der Hydroxy-Gruppen klassifiziert: 8-Hydroxy-Derivate werden als psiB, 5,8-Dihydroxy-Derivate als psiA und 8-Hydroxy-δ-Lakton-Derivate als psiC bezeichnet. Es konnte beobachtet werden, dass psiAα (8-HODE-δ-Lakton) in *A. nidulans* die sexuelle Sporenentwicklung inhibiert und die asexuelle Sporenentwicklung stimuliert, während psiBα (8-HODE) und psiCα (5,8-DiHODE) den gegenteiligen Effekt zeigten (Champe und el-Zayat, 1989, Mazur *et al.*, 1991).



**Abb.8. Klassifizierung der von 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> abgeleiteten Oxylipine (psiα) hinsichtlich der Anzahl und der Positionierung der Hydroxy-Gruppen am Fettsäurerückgrat.** (modifiziert nach Tsitsigiannis *et al.*, 2004b)

### 1.4.5 Die Familie der Psi-Faktor-produzierenden-Oxygenasen (Ppo-Enzyme)

Nachdem das Genom von *A. nidulans* vollständig sequenziert wurde, konnten durch die Arbeitsgruppe um Prof. Keller drei Gene identifiziert werden, die eine hohe Ähnlichkeit zu der Sequenz der 7,8-LDS aufwiesen (Tsitsigiannis und Keller, 2007). Bioinformatische Analysen zeigten, dass diese Enzyme eine ungewöhnliche Domänen-Architektur besitzen. So weist der N-terminalen Sequenzabschnitt eine signifikante Ähnlichkeit zu tierischen Häm-Peroxidasen auf. Der C-terminale Sequenzabschnitt zeigt hingegen eine signifikante Ähnlichkeit zu Cytochrom-P450-Enzymen.

Es konnte in *in vivo* Studien gezeigt werden, dass die entsprechenden Enzyme einen Einfluss auf die Biosynthese von Psi-Faktoren und den Entwicklungszyklus des Pilzes besitzen. Sie wurden als *ppoA*, *ppoB* und *ppoC* bezeichnet (*ppo*, engl. *psi factor producing oxygenase*).

In Untersuchungen, bei denen ein *A. nidulans*-Stamm verwendet wurde, in dem das *ppoA*-Allel ausgeschaltet worden war (*AppoA*), wurde beobachtet, dass dieser Stamm ein signifikant reduziertes Vorkommen an psiBa (8-HODE) und erhöhtes Verhältnis von asexuellen Sporen (Konidiasporen) zu sexuellen Sporen (Askosporen) aufwies (Tsitsigiannis *et al.*, 2004b).

Wurde demgegenüber das *ppoC*-Allel in *A. nidulans* ausgeschaltet (*AppoC*), so zeigte dieser Stamm ein signifikant erniedrigtes Verhältnis asexueller Sporen zu sexuellen Sporen. Außerdem konnten hier nur Spuren von psiBβ (8-HOME) nachgewiesen werden (Tsitsigiannis *et al.*, 2004a). Interessanterweise zeigte der entsprechende modifizierte *A. fumigatus*-Stamm eine veränderte Morphologie und Entwicklung des Pilzes sowie eine erhöhte oxidative Stresstoleranz (Dagenais *et al.*, 2008).

Ähnlich wie die *AppoA*-Mutante zeigte auch die entsprechende *AppoB*-Mutante ein erhöhtes Verhältnis asexueller Sporen zu sexuellen Sporen. Erstaunlicherweise wurde hier aber ein erniedrigtes Vorkommen an psiBβ (8-HOME) beobachtet (Tsitsigiannis *et al.*, 2005b).

Zudem konnte gezeigt werden, dass Ppo-Enzyme und die durch sie gebildeten Produkte nicht nur einen Einfluss auf den Entwicklungszyklus besitzen, sondern auch die Synthese von Sekundärmetaboliten beeinflussen. So konnte in der *AppoA;AppoC*-Doppelmutante wie auch in der *AppoA;AppoB;AppoC*-Tripelmutante eine Überproduktion des Antibiotikums Penicillin beobachtet werden. Gleichzeitig konnten nur noch Spuren des Mycotoxins Sterigmatocystin nachgewiesen werden (Tsitsigiannis *et al.*, 2005a). Interessanterweise war zudem die Besiedlung von Erdnuss-Samen durch *A. nidulans* in der *AppoA;AppoB;AppoC*-Tripelmutante deutlich beeinträchtigt (Brodhagen und Keller, 2006). Die *A. fumigatus AppoA;AppoB;AppoC*-Tripelmutante zeigte zudem eine erhöhte Virulenz in Hinsicht auf die pulmonale Aspergillose (Tsitsigiannis *et al.*, 2005a).

## **1.5 Die Familie der Peroxidasen**

Peroxidasen sind Enzyme, die eine heterolytische Spaltung von Peroxidbindungen katalysieren. Obwohl die sogenannten nicht Häm-Peroxidasen weitverbreitet in Prokaryoten und Eukaryoten sind, besitzen die meisten Peroxidasen Häm als Kofaktor (Zamocky *et al.*, 2008). Hierbei handelt es sich um Protoporphyrin IX, dessen Eisen durch ein Histidin als fünften Liganden komplexiert ist. Dieses Histidin wird auch als das proximale Histidin bezeichnet. Ein weiteres Histidin dient als Säure/Base-Katalysator und wird als distales Histidin bezeichnet (Welinder, 1992).

Es gibt zwei große Superfamilien von Peroxidasen: die tierischen und die nicht-tierischen Peroxidasen. Die nicht-tierischen Peroxidasen werden durch Katalase-Peroxidasen, Cytochrom-c-Peroxidasen (CcP) oder auch durch Mangan- und Lignin-Peroxidasen repräsentiert. Zu den tierischen Peroxidasen zählen insbesondere die Myelo-Peroxidasen und Lacto-Peroxidasen. Auch die Prostaglandin-H<sub>2</sub>-Synthasen, die bereits oben ausführlicher behandelt wurden (siehe 1.3.1), zählen zu den Peroxidasen, da sie neben der Dioxygenase-bzw. Cyclooxygenase-Aktivität auch eine Peroxidase-Aktivität besitzen (Zamocky *et al.*, 2008).

## **1.6 Die Familie der Cytochrom-P450-Enzyme**

Cytochrome-P450-Enzyme sind Häm-Proteine, die eine wichtige Rolle bei dem oxidativen Abbau endogener und exogener Substanzen spielen (Guengerich, 2008). In allen Cytochrom-P450-Enzymen wird das Häm-Eisen über ein proximales Cystein, das als fünfter Häm-Eisen-Ligand fungiert, kovalent komplexiert. Ein besonderes Charakteristikum für diese Enzyme stellt das Absorptionsmaximum des reduzierten Häm-CO-Komplexes bei 450 nm dar und ist maßgeblich für die Namensgebung dieser Enzymfamilie verantwortlich (Denisov *et al.*, 2005, Coon, 2005). Bei allen Cytochrom-P450-Enzymen handelt es sich um so starke Oxidantien, dass diese sogar ungesättigte Kohlenwasserstoffe hydroxylieren können. Die meisten dieser Enzyme katalysieren diese Reaktion, indem sie zwei Elektronen von einem externen Elektronen-Donor erhalten und molekularen Sauerstoff binden. In der folgenden Reaktion wird der molekulare Sauerstoff in zwei Sauerstoffatome gespalten. Eines dieser beiden Atome verlässt das System in Form von Wasser, während der andere Sauerstoff am Eisen gebunden bleibt und eine sehr reaktive Oxo-Eisen-Spezies (*Compound I*, vgl. PGHS-Reaktionsmechanismus) darstellt, die im folgenden Schritt das Substrat hydroxyliert (Denisov *et al.*, 2005). Wie bereits in 1.2.2 und 1.3.2 beschrieben, weichen die Enzyme der CYP74-Familie wie auch die PGIS und TXAS von diesem allgemeinen Reaktionsmechanismus ab (Marnett, 2008). Sie benötigen weder molekularen Sauerstoff für ihre Aktivität, noch einen externen Elektronen-Donor. Das Hydroperoxid bzw. das Endoperoxid dient hier als Sauerstoffquelle und Substrat zugleich. Damit

werden durch diese Enzyme auch keine Monooxygenase-Reaktionen katalysiert, wie es für klassische Cytochrom-P450-Enzyme bekannt ist, sondern lediglich Isomerase-Reaktionen (Marnett, 2008, Lee *et al.*, 2008).

## **1.7 Aufgabenstellung und Zielsetzung der Arbeit**

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine detaillierte Analyse von PpoA und PpoC aus *A. nidulans*. Hierzu sollte zunächst ein Expressionssystem in *E. coli* etabliert und ein Proteinreinigungsprotokoll entwickelt werden. Mit den gereinigten Enzymen sollten im Folgenden detaillierte biochemische Untersuchungen durchgeführt werden. Zunächst sollte mit Hilfe verschiedener spektroskopischer Methoden, wie z.B. UV/vis Spektroskopie oder ESR-Spektroskopie die Domänenstruktur untersucht werden. Ziel war es so Aussagen treffen zu können, ob PpoA und PpoC tatsächlich verschiedene Häm bindende Domänen besitzen, wie es durch bioinformatische Methoden vorhergesagt wird.

Darüberhinaus sollten grundlegende biochemische Parameter der Enzyme bestimmt werden. So sollte unter anderem die Substratspezifität für verschiedene Fettsäuren untersucht und das pH-Optimum der katalytischen Aktivität ermittelt werden. Außerdem sollten die Produkte der enzymatischen Reaktionen mit Hilfe von RP-HPLC, GC/MS und RP-HPLC/MS<sup>2</sup> identifiziert werden.

Weiterhin war es das Ziel der Arbeit, den Reaktionsmechanismus der beiden Ppo-Enzyme zu untersuchen. Hierzu sollten konservierte Aminosäuren identifiziert und ihre Funktion im Reaktionsmechanismus mittels gerichteter Punktmutagenesen untersucht werden. Um zusätzlich einen tieferen Einblick in den Reaktionsmechanismus zu erlangen, sollten zudem ESR-Studien durchgeführt werden, bei denen während der Reaktion gebildete Intermediate analysiert werden.

## 2. Material und Methoden

Die molekular- und mikrobiologischen Methoden wurden, falls nicht anderweitig erwähnt, wie in „Current Protocols In Molecular Biology“ (Ausubel *et al.*, 1993) beschrieben, durchgeführt.

Für die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden hitzesterilisierte Glasgefäße (8 h bei 180° C) und sterile Plastikartikel verwendet. Außerdem wurde tridestilliertes Wasser (ddH<sub>2</sub>O) verwendet.

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders erwähnt, von Sigma-Aldrich (München, Deutschland) oder Carl Roth & Co. (Karlsruhe, Deutschland) erworben. Agarose wurde von Biozym Scientific GmbH (Hess. Oldendorf, Deutschland) erhalten. Die Fettsäuren wurden bei Sigma-Aldrich (München, Deutschland) oder Cayman (Ann Harbor, USA) gekauft. Acetonitril wurden von Fisher Scientific UK Limited (Leicestershire, Großbritannien) bezogen.

#### 2.1.2 Molekularbiologische Reagenzien

Die folgenden molekularbiologischen Reagenzien wurden in der Arbeit verwendet:

##### **Molekularbiologische Kits**

Phusion<sup>TM</sup> Hot Start High Fidelity DNA-

Polymerase System

Nucleospin<sup>TM</sup> Plasmid Kit

Nucleospin<sup>TM</sup> Extraktion Kit

CloneJET<sup>TM</sup> PCR Cloning Kit

Quick-Change<sup>TM</sup> Mutagenese Kit

ABI Prism<sup>®</sup> BigDye Terminator Cycle Sequencing

Ready Reaction Kit

Chaperone Plasmid Set

Finnzymes (Espoo, Finnland)

Macherey Nagel (Düren, Deutschland)

Macherey Nagel (Düren, Deutschland)

MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)

Stratagene (Amsterdam, Niederlande)

Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)

TaKaRa Bioscience Inc. (Otsu, Japan)

##### **DNA-Marker**

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
<b>Protein-Marker</b>	
Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
<b>Enzyme</b>	
Phusion™-Polymerase	Finnzymes (Espoo, Finnland)
Pfu-Polymerase™	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)

### 2.1.3 Medien

#### Bakterienmedien

LB-Medium (Ausubel *et al.*, 1993)

Trypton/Pepton aus Casein (pankreatisch verdaut)	10 g/L; 0,1% (w/v)
Hefeextrakt	5 g/L; 0,05% (w/v)
NaCl	10 g/L; 0,1% (w/v)

Aufgefüllt mit ddH<sub>2</sub>O und anschließend bei 120 °C für 20 min autoklaviert.

2xYT-Medium

Trypton/Pepton aus Casein (pankreatisch verdaut)	30 g/L; 0,3 % (w/v)
Hefeextrakt	20 g/L; 0,2 % (w/v)
NaCl	5 g/L; 0,05 % (w/v)

Aufgefüllt mit ddH<sub>2</sub>O und anschließend bei 120 °C für 20 min autoklaviert.

LB-Platten

Dem LB-Medium wurden 1,5 % (w/v) Agar zu gegeben und es wurde autoklaviert; anschließend wurde das Medium auf 65 °C abgekühlt und mit dem entsprechenden Antibiotikum (Konzentrationen wie unten) versetzt.

#### Antibiotika

Entsprechend der Resistenz der Bakterien wurden dem Medium zur Selektion Antibiotika zugesetzt.

Diese hatten folgende Endkonzentration:

Carbenicillin:	100 µg/mL
Kanamycin:	25 µg/mL
Chloramphenicol:	34 µg/mL

## 2.1.4 Stämme

Tab.1: Verwendete Organismen und Stämme.

Organismus	Stamm	Genotyp	Referenz	Bezugsquelle
<i>Escherichia coli</i>	XL1Blue	<i>recA1endA1gyrA96 thi-1hsdR17 supE44 relA1lac[F`proAB lac9zM15 Tn19(Tetr)]</i>	(Bullock <i>et al.</i> , 1987)	Stratagene, (Heidelberg, Deutschland)
<i>E. coli</i>	BL21Star	<i>F`ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm araB::T7RNAP-tetA</i>	-	Invitrogen, (Karlsruhe, Deutschland)

## 2.1.5 Vektoren

Der folgende Klonierungsvektor und die folgenden Expressionsvektoren wurden für die Arbeit eingesetzt:

Tab.2a: Klonierungsvektor.

Vektor	Selektionsmarker	Bezugsquelle
pJET2.1/blunt	Ampicillinresistenz	MBI Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland)

Tab.2b: Expressionsvektoren.

Vektor	Selektionsmarker	Bezugsquelle
pET24a	Kanamycinresistenz	Novagen (Schwalbach/Ts, Deutschland)
pGro7 (groES-groEL-Chaperone)	Chloramphenicolresistenz	TaKaRa Bioscience Inc. (Otsu, Japan)

## 2.2 Geräte

ÄKTAprime™	GE Healthcare Life Science (München, Deutschland)
ÄKTA-FPLC™	GE Healthcare Life Science (München, Deutschland)
Kontron 340 Recorder	Kontron Instruments (München, Deutschland)
Varian Cary 100 Bio UV/vis Spektrophotometer	Varian Inc. (Palo Alto, CA, USA)
Uvikon 930 UV/vis Spektrophotometer	Kontron Instruments (München, Deutschland)
Lyophilisator	Leybold-Heraeus GmbH (Köln, Deutschland)
Mini-PROTEAN3 Electrophoresis System	Bio-Rad Laboratories GmbH (München, Deutschland)
Photometer Ultrospec. 1100 pro	GE Healthcare Life Science (München, Deutschland)
Sauerstoffelektrode	Rank Brother (Bottisham, Cambridge, England)
Sonoplus GM 70	Bandelin (Berlin, Deutschland)
Sterilbank Prettl®-Telstar BioII-A	Telstar (Terrassa, Spanien)
Thermocycler	
Mastercycler personal	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Mastercycler gradient	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Tischzentrifuge 5415 D	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Optima LE-80K Ultrazentrifuge	Beckman, Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Avanti™J-25 Zentrifuge	Beckman, Coulter GmbH (Krefeld, Deutschland)
Jasco-J810 Spektralphotometer	Jasco Labor- und Datentechnik GmbH (Groß-Umstadt, Deutschland)
Bruker Elexys E580	Bruker Biospin (Rheinstetten, Deutschland)
Agilent 1100 Series HPLC System	Agilent (Waldbronn, Deutschland)
Agilent 5973 Mass Spectrometer	Agilent (Waldbronn, Deutschland)
Agilent 6890 Gas Chromatograph	Agilent (Waldbronn, Deutschland)
Thermo Finnigan LCQ Ion Trap Mass Spectrometer	Thermo Finnigan (San Jose, CA, USA)
Surveyor HPLC System	Thermo Finnigan (San Jose, CA, USA)
Radiodetektor	Raytest (Straubenhardt, Deutschland)

## **2.3 Methoden**

### **2.3.1 Kultivierung von *Escherichia coli***

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme XL1Blue und B121Star wurden auf festem oder in flüssigem Medium kultiviert. Vorkulturen wurden in flüssigem LB-Medium (siehe 2.1.3) mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 200 rpm und 37° C schüttelnd kultiviert. Expressionskulturen wurden in flüssigem 2x YT-Medium (siehe 2.1.3) mit dem entsprechenden Antibiotikum bei 200 rpm und verschiedenen Temperaturen (28 °C bzw. 16 °C) schüttelnd kultiviert.

Um plasmidhaltige Kolonien selektieren zu können, wurde dem Nährmedium nach dem Autoklavieren ein entsprechendes Antibiotikum zugesetzt. Für pJET2.1-Klone wurde dem Medium Carbenicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/mL zugesetzt. Die pET24 Klone wurden durch Zugabe von Kanamycin in einer Endkonzentration von 25 µg/mL selektiert. Bei Verwendung des Chaperon-Plasmids (TaKaRa Bioscience Inc., Otsu, Japan) wurde zusätzlich Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 34 µg/mL zur Selektion eingesetzt.

### **2.3.2 Transformation von *E. coli***

#### **2.3.2.1 Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen zur Hitzeschock-Transformation**

Zur Präparation kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 500 mL LB-Medium mit 5-10 *E. coli*-Kolonien angeimpft und bei 37 °C für 2 h schüttelnd (200 rpm) inkubiert. Anschließend wurde die Kultur bei 20-25 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 kultiviert. Es folgte eine zehnminütige Abkühlung auf Eis und Zentrifugation bei 3220 x g und 4 °C für 10 min. Die so sedimentierten Zellen wurden in 80 mL eiskalten TB-Puffer aufgenommen.

Erneut wurden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert und dann zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 8 mL eiskalten TB-Puffer mit 560 µL DMSO resuspendiert. Die nun kompetenten Zellen wurden als 200 µL- oder 500 µL-Teilproben in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurden sie bis zur Verwendung bei –80 °C gelagert.

TB-Puffer (sterilfiltriert):

PIPES pH = 6,7 (KOH)	10 mM
MnCl <sub>2</sub>	55 mM
CaCl <sub>2</sub>	15 mM
KCl	250 mM

### 2.3.2.2 Transformation

Zur Transformation von Plasmiden in *E. coli* wurden die eingefrorenen kompetenten Zellen auf Eis aufgetaut. 100 µL der Zellsuspension wurden mit 5 µL eines Ligationansatzes bzw. 2 µL Plasmid-DNA durchmischt. Es folgte eine Inkubationsphase von mindestens 20 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen für 45-50 sec in ein Wasserbad mit einer Temperatur von 42 °C gestellt und sofort für etwa 5 min auf Eis abgekühlt. Dann wurden 900 µL LB-Medium (siehe 2.1.3) zugegeben und für 90 min bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 3220 x g für 2 min sedimentiert. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpräzipitat im verbliebenen Mediumrest resuspendiert und auf Selektionsplatten ausgestrichen. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden mit Kolonie-PCR (siehe 2.3.4.3) überprüft und analysiert.

### 2.3.3 Plasmid-DNA-Isolierung aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden 5 mL LB-Medium (siehe 2.1.3), welchem das entsprechende Antibiotikum zugesetzt wurde, mit einigen Zellen der betreffenden Bakterienkultur angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 rpm kultiviert.

Anschließend folgte die Plasmid-DNA-Isolation entsprechend des Handbuches des „Nucleospin™ Plasmid Kits“ (Macherey Nagel, Düren, Deutschland). Optional durchzuführende Schritte in dieser Beschreibung wurden nicht durchgeführt. Die DNA-Elution von der Säule erfolgte mit 50 µL ddH<sub>2</sub>O. Die isolierten Plasmide wurden bei -20 °C gelagert.

### 2.3.4 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl. *polymerase chain reaction*) ist eine effektive Methode, DNA exponentiell zu vervielfältigen. Dies geschieht mit Hilfe thermostabiler DNA-Polymerasen. Neben der zu amplifizierenden DNA werden dem PCR-Reaktionsansatz die vier Desoxyribonukleotide Adenin, Guanin, Cytosin und Thymin sowie zwei sequenzspezifische Oligonukleotide (Primer) zugegeben. Die PCR-Reaktion ist ein Zyklus, der sich in drei Schritte mit unterschiedlichen Temperaturen unterteilen lässt.

Denaturierung → thermische Trennung der DNA-Doppelhelix (94° C)

Anlagerung → Hybridisierung der Primer mit der einzelsträngigen DNA (Anzahl und Zusammensetzung der Oligonukleotide des Primers bestimmen das Temperaturoptimum)

Elongation → Verlängerung der Primer und somit eigentliche DNA-Synthese

### 2.3.4.1 Amplifizierung von *ppoC*

Für die Amplifizierung von *ppoC*-DNA-Fragmenten wurde das System der „Phusion™ Hot Start High fidelity DNA Polymerase“ (Finnzymes, Espoo, Finnland) verwendet. Dieses System verwendet eine DNA-Polymerase, an die reversibel ein sogenanntes Affibody®-Protein gebunden ist. Dieses Protein inhibiert die DNA Polymerase-Aktivität bei Raumtemperatur und verhindert somit die Amplifikation unspezifischer Produkte.

Template: pYES2/*ppoC*-DNA

Reaktionsgemisch ( $V_{\text{ges}}=50 \mu\text{L}$ ):

5x Phusion™-HF-Puffer

0,2 mM dNTP-Mix

0,2-1,0  $\mu\text{M}$  3'-Primer

0,2-1,0  $\mu\text{M}$  5'-Primer

0,02 U/ $\mu\text{L}$  Polymerase

20-100 ng DNA

Auffüllen mit ddH<sub>2</sub>O auf 50  $\mu\text{L}$

PCR-Programm:

1. Denaturierung: 3 min bei 98 °C
2. Abkühlung auf 80 °C und Zugabe der Polymerase
3. Denaturierung: 30 sec bei 98 °C
4. Anlagerung 30 sec bei 53 °C
5. Elongation: 3 min bei 72 °C
6. Wiederholung der Schritte 3 – 5: 30 x
7. Termination 5 min bei 72 °C

### 2.3.4.2 Gerichtete Punktmutagenese

Gerichtete *in vitro*-Punktmutagenesen in der Aminosäuresequenz von PpoA und PpoC wurden mit Hilfe des „Phusion™ Hot Start High Fidelity DNA Polymerase-System“ (Finnzymes, Espoo, Finnland) bzw. mit dem „QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) durchgeführt. So war es möglich, in die Plasmid-DNA genau lokalisierte Mutationen einzufügen. Hierzu wurden Oligonukleotid-Primer verwendet, die eine gewünschte Mutation enthielten und komplementär zum gegenüberliegenden Strang der Plasmid-DNA waren. Mit Hilfe dieser Primer und der Phusion™-DNA-Polymerase bzw. *Pfu*™-DNA-Polymerase wurde das Plasmid

mit der gewünschten Punktmutation amplifiziert. Anschließend wurde die Mutterstrang-DNA, die als Template diente, durch eine Inkubation mit *DpnI* verdaut. Diese Endonuklease verdaut spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA.

Reaktionsgemisch für das „Phusion™ Hot Start High Fidelity DNA Polymerase-System“

( $V_{\text{ges}} = 50 \mu\text{L}$ ):

5x Phusion™-HF-Puffer (Finnzymes, Espoo, Finnland)

0,2 mM dNTP-Mix

1 mM 3'-Primer

1 mM 5'-Primer

0,02 U/ $\mu\text{L}$  Phusion™-DNA-Polymerase (Finnzymes, Espoo, Finnland)

50 ng DNA

Auffüllen mit ddH<sub>2</sub>O auf 50  $\mu\text{L}$

Template: pET24a/*ppoA*-DNA

PCR-Programm

1. Denaturierung: 30 sec bei 98 °C
2. Denaturierung: 10 sec bei 98 °C
3. Anlagerung: 30 sec bei 55 °C
4. Elongation: 4,4 min bei 72 °C
5. Wiederholung der Schritte 2-4: 30x

Reaktionsgemisch für den „QuickChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit“ ( $V_{\text{ges}} = 50 \mu\text{L}$ ):

10x *Pfu*™-DNA-Polymerase-Puffer mit MgCl<sub>2</sub> (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

0,2 mM dNTP-Mix

1 mM 3'-Primer

1 mM 5'-Primer

2,5 U/ $\mu\text{L}$  *Pfu*™-DNA-Polymerase (Stratagene, Amsterdam, Niederlande)

5-50 ng DNA

Auffüllen mit ddH<sub>2</sub>O auf 50  $\mu\text{L}$

Template: pET 24a/*ppoC*-DNA

PCR-Programm

1. Denaturierung: 30 sec bei 95 °C
2. Denaturierung: 30 sec bei 95 °C
3. Anlagerung: 1 min bei 55 °C
4. Elongation: 20 min bei 68 °C
5. Wiederholung der Schritte 2-4: 15x

Verdau der Produkte

Der Verdau der Mutterstrang-DNA erfolgte, indem nach der Amplifikation dem PCR-Ansatz 10 U *DpnI* zugefügt wurde und anschließend für 1 h bei 37 °C inkubiert wurde.

**2.3.4.3 Kolonie-PCR**

Der Zweck einer Kolonie-PCR ist die Überprüfung von Klonen auf das transformierte Plasmid. Die Fehlerrate der verwendeten Polymerase ist hierbei ohne Bedeutung.

Aus diesem Grund wurde für die Kolonie-PCR die *Tfl*-Polymerase (Biozym, Oldendorf, Deutschland) verwendet. Weiterhin wurde die Anlagerungstemperatur für die Primer auf 58 °C erhöht. Es wurden Zellen einer Kolonie in den PCR-Ansatz überführt und die darin enthaltene Plasmid-DNA diente als DNA-Matrize für die PCR.

**2.3.5 DNA-Sequenzanalyse**

Um die korrekte Nukleotid-Sequenz der Plasmide nach erfolgter Klonierung oder Mutagenese-PCR zu überprüfen, wurde stets eine Sequenzanalyse nach (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Für die Sequenzierungsreaktion wurde der ABI Prism® BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Der Kit beruht auf der Verwendung von Didesoxynukleotiden, die aufgrund ihrer fehlenden 3'-OH-Gruppe zum Kettenabbruch bei der DNA-Polymerase-Reaktion führen (*cycle sequencing*). Die Didesoxynukleotide sind hierbei mit einem basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoff konjugiert.

Reaktionsgemisch ( $V_{\text{ges}} = 10 \mu\text{L}$ )

- 1  $\mu\text{L}$  Plasmid (200-300ng)
- 1  $\mu\text{L}$  Sequenzier-Primer (0,5  $\mu\text{M}$ )
- 1,5  $\mu\text{L}$  BDT *Ready Reaction Mix* (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
- 1,5  $\mu\text{L}$  *half term*-Puffer (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
- 5  $\mu\text{L}$  steriles Wasser

Cycle sequencing-Programm:

1. 96 °C      1 min
2. 96 °C      5 sec
3. 55 °C      15 sec
4. 60 °C      4 min
5. Wiederholung der Schritte 2-4: 25x

Nach dem *cycle sequencing* wurden die Ansätze mit 2 µL 3 M Acetat, 2 µL 125 mM EDTA und 50 µL EtOH (96 %, v/v) gefällt. Die DNA wurde durch Zentrifugation (20.000 x g, 20 min) sedimentiert. Nach dem Waschen des DNA-Niederschlags mit 70 µL Ethanol (70 %, v/v) wurde die DNA bei 90 °C für 1 min getrocknet und in 15 µL deionisiertem Formamid aufgenommen. Die Lagerung bis zur Analyse erfolgte bei -20 °C.

## 2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese

### 2.3.6.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA

Zur Auftrennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten wurde die DNA, z.B. PCR-Produkte, mit Hilfe von Agarosegele aufgetrennt. Hierzu wurde 1 % (w/v) Agarose in 1xTAE-Puffer durch kurzes Erhitzen gelöst und in die Gelträger gegossen. Vor dem Auftragen der Proben mussten diese mit 1/10 des Volumens DNA-Probenpuffer versetzt werden. Als Größenstandard wurden 3 µL des „GeneRuler™ DNA 1 kb ladder“ (MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) in einer separaten Geltasche mitgeführt. Die Gelelektrophorese wurde für 20-40 min bei einer Spannung von 120 V in 1xTAE-Puffer durchgeführt. Anschließend wurden die Gele für 5-10 min in einer Ethidiumbromid-Färbelösung (2 µg/mL) inkubiert. Ethidiumbromid ist aufgrund seiner planaren Struktur in der Lage sich reversibel in die Basenabfolge der DNA einzulagern – ein Vorgang der auch als Interkalation bezeichnet wird. Bei Bestrahlung mit UV-Licht ( $\lambda \approx 300$  nm) tritt eine Fluoreszenz im sichtbaren Lichtspektrum auf. Damit konnte die Auftrennung der DNA durch Verwendung eines Geldokumentationssystems (Raytest IDA; Herolab, Wiesloch, Deutschland) sichtbar gemacht werden.

TAE-Puffer (50x)

Tris/HCl, pH = 7,0	2 M
HAc	1 M
EDTA, pH = 8,0	0,05 M

DNA-Probenpuffer

EDTA	250 mM
Saccharose	0,2 mg/mL
Glycerin	50 % (w/v)
Bromphenolblau	0,025 % (w/v)
Xylencyanolblau	0,025 % (w/v)

**2.3.6.2 Elution von DNA aus Agarosegelen**

Die Auftrennung von DNA nach der Größe mit der Agarose-Gelelektrophorese konnte auch für die Reinigung eines PCR-Produktes oder Restriktionsverdaus genutzt werden. Bei einer sogenannten präparativen Gelelektrophorese wurden die DNA-Proben zunächst getrennt, gefärbt und anschließend unter UV-Licht ausgeschnitten. Um Mutationen in der DNA zu vermeiden, wurde bei der Fragmentisolierung darauf geachtet, dass die UV-Bestrahlung möglichst kurz und gering war. Es folgte die Reinigung mit dem „Nucleospin™ Purification Kit“ (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers. Die gereinigte DNA konnte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

**2.3.7 Klonierungsmethoden**

Zur Klonierung wurden die mit Hilfe der PCR amplifizierten DNA-Fragmente über präparative Agarosegele gereinigt und anschließend in den pJET2.1-Vektor (MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland) nach Herstellerangaben ligiert. Für die folgende Klonierung in die Expressionsvektoren wurden die DNA-Fragmente mit den Restriktionsenzymen aus dem pJET2.1-Vektor geschnitten, deren Schnittstellen zuvor über die PCR angefügt worden waren. Der Expressionsvektor wurde mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten. Anschließend wurden Vektor-DNA und Donor-DNA ligiert.

**2.3.7.1 Ligation mit dem pJET2.1-Vektor-System**

Bevor *ppoC* in den Expressionsvektor kloniert wurde, fand eine Zwischenklonierung in den pJET2.1-Vektor (MBI Fermentas, St. Leon Rot) statt. Diese ist besonders sinnvoll, da dieser Vektor eine hohe Ligationseffizienz aufweist und anschließend eine Antibiotikumselektion auf Plasmide mit Insertion möglich ist.

Die zuvor durch das „Phusion™ Hot Start High Fidelity DNA Polymerase-System“ (Finnzymes, Espoo, Finnland) amplifizierte *ppoC*-DNA besitzt glatte Enden und konnte direkt in pJET2.1-Vektor ligiert werden.

Ligationsansatz ( $V_{\text{ges}} = 20 \mu\text{L}$ )

10  $\mu\text{L}$  2x Ligationspuffer (MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland)

2  $\mu\text{L}$  *ppoC*-DNA

1  $\mu\text{L}$  pJET2.1-Vektor (50 ng/ $\mu\text{L}$ )

1  $\mu\text{L}$  T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland)

6  $\mu\text{L}$  H<sub>2</sub>O

Der Ligationsansatz wurde bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert.

### 2.3.7.2 Ligation in den Expressionsvektor pET24a

Die in den pJET2.1-Vektor ligierte DNA und die Expressionsvektor-DNA wurden durch Restriktionsverdau (siehe 2.3.7.3) mit den gewählten Restriktionsenzymen geschnitten und über präparative Agarosegele (2.3.6.2) gereinigt. Anschließend wurde die Expressionsvektor-DNA und die Donor-DNA ligiert.

Ligationsansatz ( $V_{\text{ges}} = 10 \mu\text{L}$ ):

1  $\mu\text{L}$  10x Ligationspuffer (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

3 – 5  $\mu\text{L}$  *ppoC*-DNA

2 – 3  $\mu\text{L}$  pET24a (50 ng)

1  $\mu\text{L}$  T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland)

mit ddH<sub>2</sub>O auf 10  $\mu\text{L}$  aufgefüllt. Der Ligationsansatz wurde bei 4 °C für 18 h inkubiert.

### 2.3.7.3 DNA-Restriktion

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um Enzyme, die innerhalb einer bestimmten Sequenz die DNA zerschneiden können, wobei spezifische DNA-Fragmente entstehen. Die Restriktion aus dem Klonierungsvektor erfolgte bei 37 °C für mindestens 3 h (meist über Nacht). Das Restriktionsprodukt wurde zunächst über Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.3.6.1) qualitativ überprüft und anschließend über ein präparatives Agarosegel gereinigt.

Da es einige Restriktionsenzyme gibt, die unterschiedliche Salzzusammensetzungen, -konzentration und pH-Werte für eine optimale Wirkungsweise benötigen, wurden manche Restriktionsreaktionen mit zwei oder drei Enzymen nacheinander durchgeführt. In solchen Fällen wurde die zunächst einmal

geschnittene DNA mithilfe des „Nucleospin extraction Kits“ (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) gereinigt und in einem folgenden Restriktionsverdau mit einem weiteren Enzym verdaut.

Da die *ppoC*-DNA und die pJET2.1-Vektor-DNA fast die gleiche Anzahl an Basenpaaren besitzen und sich damit durch eine Agarosegelelektrophorese nicht vollständig trennen ließen, wurde ein zusätzlicher Restriktionsverdau mit *NsbI* vorgenommen. Dieses sollte den pJET2.1-Vektor in Fragmente zerteilen, ohne aber dabei die *ppoC*-DNA zu zerschneiden.

#### Restriktionsansatz:

15 µL Plasmid-DNA

5 µL 10x Reaktionspuffer (MBI Fermentas, St. Leon Rot, Deutschland)

1 µL Enzym

auf 50 µL mit ddH<sub>2</sub>O aufgefüllt

### **2.3.8 Heterologe Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli***

Für die Expression der rekombinanten PpoA- und PpoC Proteine wurde der *E. coli*-Stamm BL21Star (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Im Fall von PpoC wurde der verwendete Bakterienstamm zusätzlich mit dem Plasmid pGro7 (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Japan) transformiert, welches für die Chaperone groES und groEL kodiert und bei der Faltung von Proteinen unterstützend wirkt. Zunächst wurde eine Vorkultur der Expressionskolonie in LB-Medium, welches das entsprechende Antibiotikum enthielt, bzw. bei Expressionen mit zwei Plasmiden die entsprechenden Antibiotika, angesetzt. Diese wurde bei 37 °C und 200 rpm für 12-18 h schüttelnd inkubiert. Mit 1/20 des Volumens dieser Kultur wurde die Expressionskultur in 2xYT-Medium angeimpft. Dem Medium wurde außerdem das entsprechende Antibiotikum zugesetzt. Um die Expression der Chaperone groES und groEL zu induzieren, wurde der Kultur Arabinose in einer Endkonzentration von 0,1 M hinzugefügt. Die Expressionskultur wurde bei 37 °C und 200 rpm so lange inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 erreicht war, dann wurde mit IPTG (Endkonzentration: 0,1 mM) induziert. Außerdem wurde der Kultur zum Zeitpunkt der Induktion 1-3 mM δ-Aminolävulinsäure und Eisenammoniumcitrat zugesetzt, um die Biosynthese von Häm zu fördern.

Für die Expression von PpoA wurde die Kultur anschließend für weitere 18 h bei 28 °C schüttelnd inkubiert. Für die Expression von PpoC wurde die Kultur für 3 d bei 16 °C schüttelnd inkubiert.

Die Zellsuspension wurde anschließend in 50 mL- bzw. 500 mL-Teilproben für 20 min bei 8.000 x g und einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.3.9 Zellaufschluss von *E. coli*-Expressionskulturen

Die bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefrorenen *E. coli*-Präzipitate wurden in PpoA-Lysispuffer oder PpoC-Lysispuffer resuspendiert. Anschließend wurde eine Spatelspitze Lysozym zugegeben, um die Zellwände der Bakterien abzubauen und gut durchgemischt. Nach 20-30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit Ultraschall (Leybold-Heraeus GmbH, Köln) (5 x 30 sec. bei 50 % Leistung & 50 % Impuls) auf Eis aufgeschlossen.

Die Zelltrümmer wurden bei  $60.000 \times g$  und  $4^{\circ}\text{C}$  für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde für Proteinreinigungen und Aktivitätstest auf Eis aufbewahrt.

#### PpoA-Lysispuffer

Tris/HCl, pH 7,6	50 mM
EDTA	5 mM
Glycerin	10 % (v/v)

#### PpoC-Lysispuffer

Tris/HCl, pH 8,0	50 mM
------------------	-------

### 2.3.10 Proteinreinigung

Die Reinigung von PpoA erfolgte mit Hilfe eines ÄKTAprime<sup>TM</sup> plus Systems (GE Healthcare, München, Deutschland) bei  $4^{\circ}\text{C}$  und mit einem ÄKTA-FPLC<sup>TM</sup> System (GE Healthcare, München, Deutschland) bei Raumtemperatur.

Die geernteten Zellen einer 100 mL-Expressionskultur wurden in 20 mL PpoA-Lysispuffer resuspendiert und mit 0.1 mg/mL Lysozym sowie 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) versetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 30 min auf Eis wurden die Zellen dreimal abwechselnd in flüssigem Stickstoff schockgefroren und in Wasser bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen wie auf Eis mit Ultraschall weiter aufgeschlossen (siehe 2.3.9). Die Zelltrümmer wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  und  $60.000 \times g$  für 20 min zentrifugiert.

#### 2.3.10.1 Source30Q-Anionenaustauscher

Der erste Schritt der Proteinreinigung wurde durch eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt. Das Prinzip der Auftrennung eines Ionenaustauschers beruht auf der elektrostatischen Wechselwirkung zwischen der geladenen Oberfläche der Proteine und der entgegengesetzten Ladung

der Säulenmatrix. Im Fall der verwendeten Anionenaustauschchromatographie ist die Säulenmatrix positiv geladen und die negativ geladenen Proteine interagieren mit den ladungstragenden Gruppen der Matrix. Die Source30Q-Matrix (GE Healthcare, München, Deutschland) besteht aus einer Mischung von Polystyren und Divinylbenzen. Als Austauscher fungiert hier eine positiv geladene quartäre Aminogruppe.

Der Zelleextrakt wurde mit einer Flussrate von 1 mL/min auf die Source30Q-Matrix (25 mL, XK 16/20 Säule; GE Healthcare, München, Deutschland) geladen. Anschließend wurde die Säule mit einer Flussrate von 3 mL/min mit 50-100 mL Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,6) gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit einem linearen Gradienten von 0-0,3 M NaCl in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,6) bei einer Flussrate von 3 mL/min und 10 min Dauer. Es wurden Fraktionen mit einem Volumen von 2 mL gesammelt. Die Fraktionen wurden mit Hilfe der Sauerstoffelektrode (siehe 2.3.15) auf Aktivität getestet und mit Hilfe von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE, siehe 2.3.11) auf Reinheit untersucht. Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität und Reinheit wurden vereinigt.

### **2.3.10.2 Superdex-S200pg-Gelfiltration**

Die Gelfiltrationschromatographie, oder auch Größenausschlusschromatographie genannt, trennt Moleküle entsprechend ihrer Größe auf. Die Matrix der verwendeten Superdex-S200pg-Gelfiltrationssäule (GE Healthcare, München, Deutschland) besteht aus Dextran, welches mit Agarose quervernetzt wird. Große Moleküle können in die Poren der Matrix schlechter eindringen als kleine Moleküle und eluieren daher zuerst. Kleinere Moleküle können hingegen in die Poren eindringen und verbleiben daher länger auf der Säule. Da die Trennungseffizienz hierbei von der Größe des verwendeten Volumens abhängig ist, wurde das Volumen der vereinigten Proben aus dem ersten Reinigungsschritt durch Zentrifugation bei 4 °C in einem Vivaspin-20-Zentrifugalkonzentrator (MWCO 100.000, Sartorius, Göttingen Deutschland) reduziert, bis ein Volumen von 2-4 mL erreicht wurde. Das Konzentrat wurde anschließend auf eine Superdex-S200pg-Gelfiltrationssäule (26/60) geladen, die zuvor mit Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,6) equilibriert worden war. Die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 1 mL/min. Fraktionen, die anschließend an der Sauerstoffelektrode enzymatische Aktivität zeigten, wurden wieder vereinigt.

### **2.3.10.3 MonoQ-Anionenaustauscher**

Für den letzten Reinigungsschritt wurde eine MonoQ 10/10-Säule (GE Healthcare, München, Deutschland) verwendet. Wie die Source30Q-Säule besteht auch diese aus einer gemischten Polystyren- und Divinylbenzen-Matrix, an welche quartäre Aminogruppen gebunden sind. Allerdings

ist die Partikelgröße bei der MonoQ-Matrix wesentlich kleiner als bei der Source30Q-Matrix (10 µm Durchmesser, anstelle von 30 µm), so dass die Bindungsstärke und -kapazität wesentlich erhöht ist. Die aus dem vorangegangenen Reinigungsschritt vereinigten Fraktionen wurden mit einer Flussrate von 1 mL/min auf die MonoQ 10/10 Säule geladen. Nach dem Waschen der Säule mit 25-50 mL Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,6) erfolgte die Elution gebundener Proteine mit einem linearen Gradienten von 0-0,3 M NaCl in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,6) bei einer Flussrate von 3 mL/min innerhalb von 10 min. Anschließend wurde das Protein wie oben beschrieben konzentriert und der Puffer dabei gegen HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) ausgetauscht.

### 2.3.11 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um die Expression von Proteinen in *E. coli* bzw. die Reinheit von Proteinen während und nach der Proteinreinigung zu überprüfen, wurde die eindimensionale SDS-PAGE modifiziert nach Laemmli (1970) durchgeführt (Laemmli, 1970). Die Proteinexpression wurde analysiert, indem 1,5 mL einer Expressionszellkultur mit Ultraschall im Lysispuffer (siehe 2.3.9) aufgeschlossen und anschließend für 5 min bei 14.000 x g zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 mL-Gefäß gegeben und das Präzipitat im Flüssigkeitsrest resuspendiert. Je 20 µL Probe wurden mit 20 µL 2xSDS-Probenpuffer kurz durchmischt. Anschließend wurden zwei kurze Ultraschallpulse auf die Suspension gegeben und für 10 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Es folgte eine Denaturierung für 3 min bei 90° C. Mit einem vergleichbaren Protokoll wurden außerdem die einzelnen Schritte der Proteinreinigung überprüft und die Reinheit der isolierten Ppo-Proteine analysiert.

Pro Geltasche konnten 10-20 µL der denaturierten Proben aufgetragen werden. Die SDS-PAGE erfolgte in der Gelelektrophoreseapparatur mit SDS-Puffer zunächst für 20 min bei einer Stromstärke von 25 mA bis zum Erreichen des Trenngels und anschließend bei 30 mA für 60-90 min.

Die SDS-Polyacrylamidgele wurden mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250 angefärbt, um die aufgetrennten Proteine sichtbar zu machen. Nachdem die Gele für etwa 30 min in der Coomassie-Färbelösung inkubiert waren, wurde die Färbelösung durch Wasser ersetzt. Es folgte ein Entfärben des Hintergrundes durch wiederholtes Aufkochen.

#### Sammelgel (4,8 %)

0,5 M Tris/HCl, pH 6,8	1,5 mL
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (12,5/1, w/v)	0,96 mL
25 % APS (w/v)	12 µL
TEMED	24 µL
Wasser	3,54 mL

Trenngel (8 %)

1,5 M Tris/HCl, pH 8,8	4 mL
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (12,5/1, w/v)	4,25 mL
25 % APS (w/v)	12,4 µL
TEMED	24,4 µL
Wasser	7,74 mL

SDS-PAGE-Puffer

Tris/HCl, pH 8,0	25 mM
Glycin	200 mM
SDS	0,1 % (w/v)

(2x) SDS-Probenpuffer

Natriumphosphat, pH 7,0	20 mM
Glycerin	20 % (v/v)
SDS 10 %	4 % (w/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)

Coomassie-Färbelösung

Methanol	40 % (v/v)
HAc	10 % (v/v)
Coomassie Brilliant Blue G250	0,25 % (w/v)

**2.3.12 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Die Proteinbestimmung erfolgte durch die kolorimetrische Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Bei dieser Methode wird zunutze gemacht, dass der Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G 250 in der Gegenwart von Proteinen eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm zu 595 nm erfährt. Innerhalb eines Absorptionsbereiches von unter 1 (gemessen gegen proteinfreie Bradford-Lösung als Leerwert) ist das Verhältnis von Absorption und Proteinkonzentration in etwa linear, so dass über die Absorption bei 595 nm die Proteinkonzentration bestimmt werden kann. Hierfür wurde eine Eichgrade mit BSA in einem Bereich von 0-10 µg erstellt, anhand derer die Proteinkonzentration ermittelt werden konnten. Für die Messung wurden 20 µL Proteinlösung mit 1 mL Bradford-Reagenz versetzt und für etwa 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der

Proteinkonzentration erfolgte am Spektrophotometer (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) bei 595 nm gegen Bradford-Reagenz ohne Proteinlösung als Referenz.

#### Bradford Reagenz

Wasser	425 mL
Phosphorsäure (85 %, v/v)	50 mL
Ethanol (96 %, v/v)	25 mL
Serva Blue G	35 mg

### **2.3.13 Bestimmung der Ppo-Aktivität**

#### **2.3.13.1 Umsetzung von Fettsäuren**

Die Umsetzung freier ungesättigter Fettsäuren erfolgte entweder in 1 mL Zellextrakt (PpoA/PpoC im jeweiligen Lysispuffer; siehe 2.3.9) oder in 1 mL HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4), der PpoA in der Konzentration von 100 nM-1  $\mu$ M enthielt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 100  $\mu$ M-1 mM Fettsäure oder 5.5 MBq [ $1\text{-}^{14}\text{C}$ ]-markierter Fettsäure gestartet. Die Inkubation erfolgte schüttelnd bei Raumtemperatur für 30-60 min, so dass genügend Sauerstoff in das Reaktionsgemisch gelangen konnte. Die Inkubation wurde durch die Zugabe von 2 mL Diethylether gestoppt und die Fettsäuren und deren gebildete Derivate extrahiert. Anschließend folgte ein zweiter Extraktionsschritt mit 2 mL Diethylether und 100  $\mu$ L Essigsäure. Zur Phasentrennung wurde kurz bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die vereinigten Diethyletherphasen wurden unter Stickstoff bis zur Trockene eingengt. Anschließend wurde das Produkt in 30-80  $\mu$ L MeCN/H<sub>2</sub>O/HAc (50/50/0,1, v/v/v) aufgenommen und für die folgenden Analysen bei -20 °C aufbewahrt.

#### **2.3.13.2 Inkubation unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre**

Die Inkubation unter  $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre wurde in Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (50 mM, pH 7,2) (PpoA) bzw. Tris/HCl (50 mM, pH 8,0) (PpoC) durchgeführt. Der Puffer wurde hierzu 15-30 min im Ultraschallbad entgast und auf Eis mit  $^{18}\text{O}_2$  inkubiert. Hierzu wurde das  $^{18}\text{O}_2$  langsam in das Puffer-System eingeführt. Anschließend wurden 1 mM 18:2 <sup>$\Delta$ 9,12</sup> zugegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 125 nM PpoA bzw. 100  $\mu$ L PpoC-Zellextrakt gestartet. Während der Inkubation wurde das Reaktionsgemisch weiter mit  $^{18}\text{O}_2$  angereichert. Nach 30 min Inkubation wurde die Reaktion durch die Zugabe von Diethylether gestoppt und die gebildeten Produkte wie in 2.3.13.1 beschrieben extrahiert.

### 2.3.13.3 Methylierung von Fettsäuren

Für die nachfolgende Analyse von Fettsäuren mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) ist es notwendig, dass die zu analysierenden Fettsäuren als Methylester vorliegen. Dazu wurden die Produkte über die RP-HPLC getrennt und anschließend mit (Diazomethyl)-Trimethylsilan methyliert.

Die bis zur Trockene eingedampften Proben wurden in 400  $\mu\text{L}$  Methanol aufgenommen und anschließend mit 6,5  $\mu\text{L}$  2 M (Diazomethyl)-Trimethylsilan (in Hexan; Sigma-Aldrich, München, Deutschland) versetzt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 30 min schüttelnd wurden 2  $\mu\text{L}$  1/10 verdünnte Essigsäure zugegeben und die Proben gemischt, um überschüssiges (Diazomethyl)-Trimethylsilan zu zersetzen. Anschließend wurde unter Stickstoff bis zur Trockene eingedampft.

### 2.3.13.4 Kolorimetrischer Nachweis der Peroxidase Aktivität

Die Peroxidase-Aktivität von PpoA und PpoC wurde mit Hilfe eines Test-Systems nachgewiesen, das erstmals von Kulmacz für Analyse der Peroxidase-Aktivität der PGHS verwendet worden war (Kulmacz, 1987). Eine Peroxidase-Reaktion besteht aus der Reduktion eines Hydroperoxids zu einem Hydroxid. Wird diese Reaktion in der Gegenwart von *N,N,N',N'*-Tetramethyl-p-Phenylendiamin (TMPD) durchgeführt, so wird dieses Kosubstrat oxidiert und ein blaues mesomeriestabilisiertes Radikal-Intermediat wird gebildet. Diese Reaktion kann qualitativ an einem Spektrophotometer anhand der Absorptionzunahme bei 611 nm in Abhängigkeit der Zeit verfolgt werden und stellt so eine prinzipielle Evidenz für die Peroxidase-Aktivität dar.

Für dieses Experiment wurden 100  $\mu\text{M}$  TMPD und 100  $\mu\text{M}$  hydroperoxidfreie 18:2 <sup>$\Delta^9\text{Z},12\text{Z}$</sup>  in 1 mL HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) gelöst und mit 125 nM PpoA bzw. PpoC bei Raumtemperatur inkubiert. Die Peroxidase-Aktivität wurde anhand der Absorptionzunahme bei 611 nm nachgewiesen.

## 2.3.14 Analyse der Ppo-Produkte

### 2.3.14.1 Analyse der Produktbildung mittels Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC)

Bei der RP-HPLC (RP, engl. *reversed phase*) findet eine hydrophobe Wechselwirkung des Analyten in der mobilen Phase mit der stationären Phase, ein mit C<sub>18</sub>-Kohlenstoffketten modifiziertes Kieselgel, im polar-wässrigen Lösungsmittel statt. Die Elution erfolgt durch ein unpolares organisches Lösungsmittel, das mit dem adsorbierten Molekül um die Bindungsstelle konkurriert. Um ein möglichst hohes Auflösungsvermögen zu erhalten und die Trennkapazität zu optimieren, wurde ein

Lösungsmittelgradient mit steigender Hydrophobizität verwendet. Auf diese Weise wurde die Elutionskraft sukzessiv erhöht.

Die zu analysierende Probe wurde zunächst bis zur Trockene eingengt und anschließend in 80 µL RP-Laufmittel (MeCN/H<sub>2</sub>O/HAc, 50/50/0,1, v/v/v) aufgenommen. Die Auftrennung der Fettsäuren und korrespondierenden Derivaten erfolgte über RP-HPLC. Es wurde eine EC-250/2-Nucleosil-120-5-C<sub>18</sub>-Säule (250 x 2 mm, 5 µm Partikelgröße, Macherey Nagel, Düren, Deutschland) und ein Agilent 1100-HPLC-System (Waldbronn, Deutschland) verwendet, an welches ein Dioden-Array-Detektor gekoppelt war. Da die untersuchten Verbindungen kein konjugiertes π-Elektronen-Doppelbindungs-System besitzen, absorbierten sie bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 202$  nm und konnten so detektiert werden. Das System wurde mit den folgenden Laufmitteln verwendet:

Laufmittel A: MeCN/H<sub>2</sub>O/HAc, 50/50/0,1, v/v/v

Laufmittel B: MeCN/HAc, 100/0,1, v/v

Der Lösungsmittelgradient war wie folgt:

Flussgeschwindigkeit 0,18 mL/min, 0-5 min, 100 % Laufmittel A; 5-20 min von 100 % Laufmittel A zu 100 % Laufmittel B; 20-22 min Erhöhung der Flussgeschwindigkeit auf 0,36 mL/min; 22-27 min 100 % Laufmittel B; 27-32 min von 100 % Laufmittel B auf 100 % Laufmittel A; 32-35 min 100 % Laufmittel A; 35-41 min Erniedrigung der Flussgeschwindigkeit auf 0,18 mL/min.

### 2.3.14.2 Analyse der Produktbildung mittels Radio-RP-HPLC

Zusätzlich zum Dioden-Array-Detektor wurde bei der Radio-RP-HPLC ein Szintillations-Detektor, der radioaktive Strahlung detektieren kann, eingesetzt. Als Substrat diente [1-<sup>14</sup>C]-markierte 18:2<sup>Δ<sup>9</sup>Z,12Z</sup>. Die Durchführung der Analyse erfolgte analog zur RP-HPLC-Trennung (siehe 2.3.14.1).

### 2.3.14.3 Sterische Analyse mittels Normalphasen-HPLC (SP-HPLC) und Chiralphasen-HPLC (CP-HPLC)

Für die sterische Analyse des 8-Hydroperoxy-Fettsäurederivats wurde dieses nach RP-HPLC-Reinigung zunächst bis zur Trockene eingengt, in SnCl<sub>2</sub>-MeOH-Lösung (300 µg/900 µL) aufgenommen und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das so zum entsprechenden Hydroxy-Fettsäurederivat reduzierte Produkt wurde wie oben beschrieben mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.13.1), anschließend bis zur Trockene eingengt und in 30 µL n-Hexan/2-Propanol/HAc (100/1/0,1, v/v/v) aufgenommen. Zunächst erfolgte dann eine weitere Reinigung über SP-HPLC (engl. *straight phase*-HPLC). Für die SP-HPLC eine Zorbax-SIL-Säule (4,6 x 250 mm, 5 µm Partikelgröße; Agilent, Waldbronn, Deutschland) verwendet. Das Laufmittelsystem war n-Hexan/2-Propanol/HAc (100/1/0,1, v/v/v) und die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 0,2 mL/min. Das 8-Hydroxy-Fettsäurederivat

wurde anschließend mit Diethylether extrahiert. Nach Entfernung des Diethylethers unter dem Stickstoffstrom wurde der Extrakt in 30  $\mu\text{L}$  n-Hexan/2-Propanol/HAc (100/5/0,1, v/v/v) aufgenommen. Die sterische Analyse erfolgte mit einer Daicel CHIRALCEL<sup>®</sup>-OD-H-Säule (2,1 x 150 mm, 5  $\mu\text{m}$  Partikelgröße von VWR (Darmstadt, Deutschland). Das Laufmittelsystem war n-Hexan/2-Propanol/HAc (100/5/0,1, v/v/v) und die Elution erfolgte mit einer Flussrate von 0,2 mL/min.

#### 2.3.14.4 Produktanalyse mittels GC/MS

Die gebildeten Hydroxy-Produkte wurde mittels GC/MS identifiziert. Hier wurden die Produkte zunächst über die GC getrennt und anschließend im MS mittels Elektronenstoßionisation (EI, engl. *Electron impact*) analysiert. Um eine deutliche Fragmentierung zu erhalten, wurden die Analyten mit Bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) derivatisiert. Diese Substanz substituiert Hydroxid-Protonen durch eine Trimethyl-Silylgruppe und setzt somit die Polarität der Moleküle herab und stabilisiert diese dadurch thermodynamisch.

Nach der Trennung über RP-HPLC wurden die Produkte mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.13.1) und im Stickstoffstrom bis zur Trockene eingengt. Für die GC/MS-Analyse wurden die Hydroperoxy-Fettsäurederivate mit  $\text{SnCl}_2$  reduziert (siehe 2.3.14.3) und methyliert (siehe 2.3.13.3). Die Fettsäure-Methylester-Derivate wurden in 3  $\mu\text{L}$  MeCN aufgenommen und mit 1  $\mu\text{L}$  BSTFA versetzt. Die Analyse erfolgte an einem Agilent 5973-Massenspektrometer (Waldbronn, Deutschland), das mit einem Agilent-GC-6890-Gaschromatograph (Waldbronn, Deutschland) verbunden war. Die Trennung der Analyten erfolgte über eine DB-23-Säule (30 m x 0,25 mm, Filmdicke 0,25  $\mu\text{m}$ , J&W Scientific, Agilent, Böblingen, Deutschland). Als Trägergas wurde Helium verwendet (1 mL/min). Der Temperaturgradient war 150 °C für 1 min, 150-200 °C mit 4 °C/min, 200-250 °C mit 5 °C/min und 250 °C für 6 min.

#### 2.3.14.5 Produktanalyse mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup>

Bei der HPLC/MS-Analyse wurden die zunächst mittels RP-HPLC getrennten Analyten mit Hilfe der Elektronensprayionisation (ESI) in das Vakuum des Massenspektrometers (MS) überführt. Die dabei gebildeten Ionen wurden anschließend mit einer elektrischen Ionenfalle entsprechend des Masse/Ladungs-Quotienten ( $m/z$ ) analysiert. Durch Verwendung eines Ionenfallen-Massenspektrometers konnten die Analytionen außerdem mittels kollisions-induzierter Dissoziation (CID, engl. *collision induced dissociation*) mit Helium als Kollisions-Gas in Tochterionen fragmentiert und anschließend analysiert werden (MS<sup>2</sup>).

Nach Umsetzung der Substrate und anschließender Extraktion (siehe 2.3.13.1) wurden für die RP-HPLC/MS-Analyse die Produkte in 30  $\mu$ L MeCN/H<sub>2</sub>O/HAc (50/50/0,1, v/v/v) aufgenommen. Die HPLC-Trennung erfolgte an einem Surveyor HPLC-System (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA), das mit einer EC-250/2-Nucleosil-100-5-C<sub>18</sub>-Säule (250 x 2,1 mm, 5  $\mu$ m Partikelgröße; Macherey Nagel Düren, Deutschland) ausgestattet war. Das System wurde mit den folgenden Laufmitteln verwendet:

Laufmittel A: MeCN/H<sub>2</sub>O/HAc, 40/60/0,1, v/v/v

Laufmittel B: MeCN/HAc, 100/0,1, v/v

Der Lösungsmittelgradient war wie folgt:

Flussgeschwindigkeit 0,2 mL/min, 0-10 min, 80 % Laufmittel A und 20 % Laufmittel B; 10-30 min von 80 % Laufmittel A und 20 % Laufmittel B zu 100 % Laufmittel B; 30-35 min Erhöhung der Flussgeschwindigkeit auf 0,3 mL/min; 35-40 min 100 % Laufmittel B; 44,5-45 min von 100 % Laufmittel B auf 80 % Laufmittel A und 20 % Laufmittel B und Erniedrigung der Flussgeschwindigkeit auf 0,2 mL/min.

Das Massenspektrometer war ein LCQ-Ionenfallen-Massenspektrometer (Thermo Finnigan, San Jose, CA, USA). Es wurden die durch ESI erzeugten negativen Ionen gemessen. Die Kapillartemperatur war 300 °C und die Kapillarspannung war 27 kV. Für Tandem-MS-Analysen wurde eine Kollisionsenergie von 1 V verwendet.

### **2.3.14.6 Abfangen kohlenstoffzentrierter Fettsäure-Radikale mit Hilfe von stabilen Nitroxyl-Radikalen**

Kohlenstoffzentrierte Fettsäureradikale, die während der Reaktion von PpoA/C mit 18:2 <sup>$\Delta$ 9Z,12Z</sup> gebildet wurden, konnten mit dem Radikalfänger 3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-N-oxyl (Cm $\Delta$ P) abgefangen werden. Hierzu wurden 1 mM 18:2 <sup>$\Delta$ 9Z,12Z</sup>, 2 % EtOH (v/v) und 5 mM EDTA in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) gelöst und im Ultraschallbad für 15 min entgast. Anschließend wurden 500  $\mu$ L des HEPES-Puffers versetzt mit 5 mM Cm $\Delta$ P zugegeben, vorsichtig gemischt und abermals im Ultraschallbad entgast. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 125 nM PpoA bzw. PpoC gestartet. Das Reaktionsgemisch wurde mit Argon überschichtet, um die Diffusion von Atmosphären-Sauerstoff in die Lösung zu verhindern. Nach 30 min wurde die Reaktion durch die Zugabe von 2 mL Diethylether gestoppt und die Reaktionsprodukte sowie die Fettsäure extrahiert (siehe 2.3.13.1). Es folgte die Produktanalyse mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> (siehe 2.3.14.5), bei der positive Ionen mit  $m/z$  50-600 analysiert wurden.

### 2.3.15 Biochemische Charakterisierung an der Sauerstoffelektrode

Der Sauerstoffverbrauch im Reaktionspuffer durch Reaktion von PpoA oder PpoC mit dem Fettsäuresubstrat konnte mit einer Sauerstoffelektrode gemessen werden. Das Messprinzip beruht darauf, dass Sauerstoff auf der Elektrode zu  $\text{OH}^-$ -Ionen reduziert wird. Der dabei entstehende Diffusionsstrom ist dann direkt proportional zur Sauerstoffkonzentration. Fremdionen in der Lösung werden nicht reduziert bzw. oxidiert, weil die Elektrode durch eine Teflonmembran abgedichtet ist, die nur gelöste Gase durchlässt.

#### 2.3.15.1 Herstellung von Natriumfettsäuresalzen

Um eine homogene Lösung der Fettsäuren im wässrigen Medium mit definierten Konzentrationen zu gewährleisten, wurden die Natriumsalze der Fettsäuren als Substrate verwendet.

Um diese Natriumfettsäuresalzen herzustellen, wurden 70 mg Fettsäure mit 70 mg Tween20 und 4 mL sauerstofffreiem Wasser versetzt. Die Suspension wurde mit einer Pipette homogenisiert, wobei auf die Vermeidung von Luftblasen zu achten war. Anschließend wurde 0,5 N NaOH zugegeben, bis die Lösung klar wurde. Es wurde bis zu einem Volumen von 25 mL aufgefüllt und mit Stickstoff durchspült. Die Lösung wurde in 1-2 mL-Teilproben aufgeteilt und bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur Verwendung eingefroren.

#### 2.3.15.2 Bestimmung des pH-Optimums und kinetischer Konstanten

Zu Beginn der Messung war eine Kalibrierung der Sauerstoffelektrode (Rank Brothers, Bottisham, Cambridge, England) nötig. Diese erfolgte anhand einer mit Luftsauerstoff gesättigten wässrigen Messlösung, deren Sauerstoffgehalt bei  $24^\circ\text{C}$  und 1013 mbar 8,25 mg/L bzw. 257,8  $\mu\text{mol/L}$  entspricht. Durch Zugabe von  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  wurde der gesamte gelöste Sauerstoff reduziert, so dass der Nullpunkt des Messbereichs erreicht wurde. Die Berechnung des absoluten Sauerstoffverbrauches wurde unter der Annahme einer linearen Abhängigkeit des Elektrodenpotentials zur Sauerstoffkonzentration durchgeführt. Die Temperatur des Reaktionsmediums wurde durch ein temperierbares Wasserkühlungssystem konstant auf  $24^\circ\text{C}$  gehalten. Vor der Messung wurde die Pufferlösung gegen Luft (1 atm) equilibriert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe einer definierten Substratmenge oder alternativ durch die Zugabe von PpoA initiiert.

Für die Bestimmung des pH-Optimums der Ppo-Aktivität wurde der initiale Verbrauch von Sauerstoff für die Reaktion von 125 nM PpoA mit 100  $\mu\text{M}$  18:2<sup>A9Z,12Z</sup> in 1 mL Puffer bei verschiedenen pH-Werten bestimmt. Die folgenden Puffer wurden für die jeweiligen pH-Werte verwendet: 0,2 M Acetat-Puffer, pH 4,5-5,5, 0,2 M Phosphat-Puffer, pH 5,5-8,0 und 0,2 M Borat-Puffer, pH 8,0-10,5.

Für die Analyse der kinetischen Konstanten wurde der initiale Verbrauch von Sauerstoff für die Reaktion von 125 nM PpoA in 1 mL Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,2) bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt. Als Substrate dienten die Natriumsalze von 16:1<sup>Δ9Z</sup>, 18:1<sup>Δ9Z</sup>, 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup>, 18:3<sup>Δ9Z,12Z,15Z</sup>. Die kinetischen Parameter wurden mit Hilfe der Hanes-Woolf-Gleichung berechnet. Alternativ konnten diese Werte auch anhand der Michaelis-Menten-Gleichung mit Hilfe der Software Origin 6.0 kalkuliert werden.

## 2.3.16 Spektroskopische Analysen

### 2.3.16.1 UV/vis Spektroskopie

Bei der UV/vis-Spektroskopie handelt es sich um eine Spektroskopie, bei der elektromagnetische Strahlen des ultravioletten (UV) und des sichtbaren Lichts (vis, engl. *visible*) genutzt werden. UV/vis-Spektren von PpoA wurden standardmäßig in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) bei Raumtemperatur aufgenommen. Hierzu wurde entweder ein Varian Cary 100 Bio UV/vis Spektrophotometer (Varian Inc., Palo Alto, CA, USA) oder alternativ ein Uvikon 930 UV/vis Spektrophotometer (Kontron Instruments, München, Deutschland) verwendet.

Häm-Eisen kann durch die Zugabe von Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> reduziert werden. Das reduzierte CO-Spektrum wurde wie bei Omura und Sato beschrieben erzeugt (Omura und Sato, 1964a, Omura und Sato, 1964b). Hierzu wurde PpoA zunächst mit einem Überschuss an Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> reduziert. Anschließend wurde CO, welches durch die Reaktion von HCOOH und H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gewonnen wurde, in das System eingeführt. Das UV/vis-Spektrum wurde sofort und nach 5 bis 10 min aufgenommen.

### 2.3.16.2 Circular dichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie)

Als Circular dichroismus (CD, engl. *circular dichroism*) Spektroskopie wird die Methode bezeichnet, mit der die optische Aktivität chiraler Moleküle in Lösung analysiert werden kann. Ein sogenanntes CD-Spektrum gibt damit Auskunft, wie circular polarisiertes Licht von optisch aktiven Substanzen absorbiert wird. Somit können Aussagen über die korrekte, d.h. native Faltung eines Proteins erhalten werden. CD-Spektren wurden in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) an einem Jasco J-810 Chiro-optical Spectrometer (JASCO, Groß-Umstadt, Deutschland) aufgenommen.

### 2.3.16.3 Elektron-Spin-Resonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie)

Die Technik der ESR-Spektroskopie entspricht konzeptionell der Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR-Spektroskopie, engl. *nuclear magnetic resonance*). So basieren beide Methoden auf der Interaktion von elektromagnetischer Strahlung mit magnetischen Momenten. Im Fall der ESR-Spektroskopie entstehen die magnetischen Momente durch Elektronen und sie ist somit auf paramagnetische Substanzen beschränkt. Chemische Substanzen gelten dann als paramagnetisch, wenn sie freie ungepaarte Elektronen besitzen, wie es z.B. bei Radikalen oder Übergangsmetallionen der Fall ist. Diese Art der Spektroskopie ermöglicht es, die elektronische Struktur der Häm-Eisen(III)-Komplexe in PpoA zu untersuchen. Außerdem können verschiedene während der Reaktion intermediär gebildete Häm-Eisen-Spezies sowie radikalische Intermediate analysiert werden.

Das Prinzip der ESR-Spektroskopie basiert auf der Absorption von Mikrowellenstrahlung durch ungepaarte Elektronen, die sich in einem von außen angelegten Magnetfeld befinden. Entsprechend der Quanten-Theorie können in dem Magnetfeld für Elektronen nur zwei verschiedene Orientierungen existieren: parallel oder antiparallel zum Feld. Als parallel wird der Grundzustand des Elektrons bezeichnet, der der Magnetfeldorientierung entspricht und einen Spin von  $m = -\frac{1}{2}$  besitzt. Als antiparallel wird der angeregte Zustand bezeichnet, bei dem sich das Elektron entgegen des Magnetfeldes orientiert und eine Spin von  $m = +\frac{1}{2}$  besitzt. Der energetische Abstand dieser beiden Energieniveaus  $\Delta E$  weist eine lineare Abhängigkeit zu der angelegten Magnetfeldstärke auf. Resonanzbedingungen sind dann erreicht, wenn gilt:

$$\Delta E = h \cdot \nu = g \cdot \mu_B \cdot H_0$$

$h$  = Plancksches Wirkungsquantum =  $6,6260755 \times 10^{-34}$  Js

$\nu$  = Frequenz der Mikrowellenstrahlung [1/s]

$g$  =  $g$ -Faktor (Landé-Faktor)

$\mu_B$  = Bohrsches Magneton =  $0,92740154 \times 10^{-23}$  J/T

$H_0$  = Feldstärke des äußeren Magnetfeldes [G]

Es gibt damit zwei verschiedene denkbare Messanordnungen, um die Resonanzbedingung zu erhalten: entweder wird die Frequenz der Mikrowellenstrahlung bei konstantem Feld variiert oder die Mikrowellenfrequenz wird konstant gehalten und die Magnetfeldstärke wird variiert. Aus technischen Gründen wird bei der ESR-Spektroskopie die Mikrowellenfrequenz konstant gehalten und die Magnetfeldstärke variiert.

Der oben erwähnte  $g$ -Faktor für ein vollkommen freies Elektron besitzt einen Wert von  $g = 2,0023$ . Dieser Wert variiert für ein ungepaartes Elektron in einem Radikal oder Übergangsmetallion und ist abhängig von der Umgebung des Elektrons bzw. der Wechselwirkung mit anderen magnetischen Momenten. Er gibt somit Aufschluss über die elektronische Umgebung des ungepaarten Elektrons.

Die ESR-Spektren wurden im Rahmen einer Kooperation mit PD. Dr. Marina Bennati (Max Planck Institut für biophysikalische Chemie; Göttingen) von Dr. Alistair Fielding aufgenommen. Für die spektroskopische Analysen wurde PpoA in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) mit Endkonzentrationen von 100-300  $\mu\text{M}$  verwendet. Inkubationen von PpoA mit 18:2 <sup>$\Delta^{9Z,12Z}$</sup>  bzw. 8R-HPODE erfolgten auf Eis mit einem 20-40-fachen Substratüberschuss; die Reaktion wurde nach einem definierten Zeitpunkt (2 s, 45 s, 2 min) durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt.

Konventionelle ESR-Spektren wurden bei 9,4 GHz an einem Bruker Elexsys E580 Spektrometer (Bruker Biospin, Rheinstetten, Deutschland) aufgenommen, das mit einer *Super High Q Cavity* ausgestattet war. Die Spektren wurden bei 4 K mit einer Amplitudenmodulation von 4 G und einer Mikrowellenleistung von 1 mW, bei 20 K mit einer Amplitudenmodulation von 7 G und Mikrowellenleistung von 0,127 mW und bei 110 K mit einer Amplitudenmodulation von 3 G und einer Mikrowellenleistung von 0,0127 mW aufgenommen.

### 2.3.17 Untersuchungen des kinetischen Isotopie-Effekts (*KIE*)

Als Isotope werden chemische Elemente bezeichnet, die eine gleich Ordnungszahl aufweisen, aber durch eine unterschiedliche Anzahl an Neutronen verschiedene Massenzahlen haben. Die verschiedenen Isotope eines bestimmten Atoms unterscheiden sich im chemischen Sinne nicht und gehorchen weitestgehend den selben chemischen Prinzipien. Und dennoch beeinflussen die unterschiedlichen Massen das dynamische Verhalten der Isotope, ähnlich wie schwerere Gegenstände sich langsamer bewegen als leichtere.

Auf dieser Grundlage können kinetische Isotopie-Effekte (*KIE*) gemessen werden: Diese werden im einfachsten Fall durch unterschiedliche nukleare Vibrationen der Isotope hervorgerufen. Eine chemische Bindung kann als ein Oszillator angesehen werden. Dieser besitzt auch im Grundzustand ein gewisses Maß an Vibrationsenergie, die als Nullpunkt Vibrationsenergie bezeichnet wird (ZPVE; engl. *zero-point vibrational energy*). Die ZPVE ist von der Masse des Oszillators abhängig und nimmt mit zunehmender Oszillatormasse ab. Diese für verschiedene Isotope unterschiedliche ZPVE beeinflusst die Energie, die benötigt wird, um die energetische Barriere zur Bindungsspaltung zu überwinden. Eine so veränderte Aktivierungsenergie beeinflusst wiederum Reaktionsgeschwindigkeit. Für die Berechnung eines *KIE* gilt:

$$KIE = \frac{k_H}{k_D}$$

*KIE* = kinetischer Isotopie-Effekt

$k_H$  = Geschwindigkeitskonstante für protoniertes Substrat

$k_D$  = Geschwindigkeitskonstante für deuteriertes Substrat

Wird ein *KIE* für die Spaltung einer Bindung beobachtet, bei der eines der beiden Atome durch ein Isotop ausgetauscht ist, so wird dieser als primärer *KIE* bezeichnet. Als sekundärer *KIE* wird hingegen die Geschwindigkeitsänderung bezeichnet, die beobachtet wird, wenn ein Atom gegen ein Isotop ausgetauscht ist, welches nicht direkt an der betreffenden Bindung beteiligt ist. In einigen Reaktionen, bei denen der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Spaltung einer Wasserstoffbindung ist, können zudem sehr hohe *KIE* beobachtet werden, die nur durch einen quantenmechanischen Prozess erklärt werden können, der als „Tunneln“ bezeichnet wird. Die Masse von Wasserstoff- bzw. Deuteriumatomen ist klein genug als dass sie nicht notwendigerweise die Energiebarriere zur Bindungsspaltung überschreiten muss. Stattdessen bleiben die Atomkerne unterhalb der Energiebarriere und tunneln durch diese an sich „verbotene Zone“ vom Edukt zum Produkt (Scheiner, 2000).

Die Analysen des *KIE* wurde mit 18:1<sup>Δ9Z</sup> und am C-8 deuterierter 18:1<sup>Δ9Z</sup> (8-[D<sub>2</sub>]-18:1<sup>Δ9Z</sup>) durchgeführt. 8-[D<sub>2</sub>]-18:1<sup>Δ9Z</sup> wurde von André Nadler in der Arbeitsgruppe von Prof. Diederichsen (Institut für organische und biomolekulare Chemie, Universität Göttingen) synthetisiert. Die kinetischen Analysen erfolgten an einer Sauerstoffelektrode (vgl. 2.3.15.2) in Tris/Maleat (50 mM; pH 7,3) bei 18 °C. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von 100 nM PpoA gestartet.

## 3. Ergebnisse

*A. nidulans* ist ein homothallischer Ascomycet, der zu der Schimmelpilzgattung *Aspergillus* (Gießkannenschimmel) gehört und als Modellsystem für die Erforschung der pilzlichen Entwicklung dient. Das wissenschaftliche Interesse an *A. nidulans* begründet sich unter anderem auf der Eigenschaft des Pilzes, sich sowohl mit asexuell wie sexuell gebildeten Sporen vermehren zu können. Außerdem sind nah verwandte Arten wie z.B. *Aspergillus flavus* und *Aspergillus fumigatus* weit verbreitete Krankheitserreger (Aspergillose – „Fluch des Tut-Ench-Amun“) bzw. Produzenten von krebserregenden Stoffwechselprodukten, den sogenannten Mycotoxinen.

Signalmoleküle, die sowohl die sexuelle bzw. asexuelle Entwicklung des Pilzes beeinflussen wie auch die Mycotoxinbildung regulieren, sind deshalb von besonderem Interesse. Neuere Daten belegen, dass zentrale Signalmoleküle durch die enzymatische Oxidation aus Fettsäuren entstehen. Mögliche Kandidatengene, die für die enzymatische Aktivität kodieren könnten, wurden erstmals 2004 beschrieben. Die entsprechenden Proteine wurden als Ppo-Enzyme (Ppo, engl. *psi factor producing oxygenase*) bezeichnet. Bisher wurden in *A. nidulans* drei solcher Enzyme identifiziert; diese wurden als PpoA, PpoB und PpoC benannt.

Im Folgenden werden die biochemischen Eigenschaften von PpoA und PpoC dargestellt.

### **3.1 Domänenstruktur und Aminosäuresequenzvergleiche**

Eine Analyse konservierter Proteindomänen mit Hilfe der NCBI-Datenbank (engl. *National Center for Biotechnology Information*) zeigte, dass die Aminosäuresequenzen von PpoA und PpoC Sequenzmotive aufweisen, die charakteristisch für zwei verschiedene Enzym-Familien sind: Der N-terminale Sequenzabschnitt (Aminosäuren 210-580 von PpoA und 181-650 von PpoC) weist Ähnlichkeit zu Fettsäure-Häm-Dioxygenasen/Peroxidasen auf, während der C-terminale Sequenzabschnitt (Aminosäuren 650-1050 von PpoA und 765-1080 von PpoC) Ähnlichkeit zu Cytochrome-P450-Enzymen besitzt.

In Abb. 9 sind partielle Aminosäuresequenzvergleiche der beiden Domänen mit Sequenzen von anderen bekannten Fettsäure-Häm-Dioxygenasen/Peroxidasen bzw. Cytochrom-P450-Enzymen dargestellt. Der Aminosäuresequenzvergleich der Fettsäure-Häm-Peroxidase/Dioxygenase-Domänen von PpoA und PpoC mit den Aminosäuresequenzen der PGHS-1 und PGHS-2 aus *O. aries* sowie der 7,8-LDS aus *G. graminis* zeigt, dass mehrere verschiedene Aminosäurereste in allen sechs Sequenzen konserviert sind. So ist unter anderem das distale und proximale Histidin sowie das katalytische Tyrosin der PGHS-1 und PGHS-2 in allen Sequenzen vorhanden. Letzteres ist in der PGHS-1,

PGHS-2 und vermutlich auch in der 7,8-LDS für die Bildung eines Radikals verantwortlich, welches für die Abstraktion des Wasserstoffatoms vom Fettsäurerückgrat nötig ist (siehe hierzu 1.3.1). Darüber hinaus ist in der PGHS und 7,8-LDS ein konserviertes Valin für die Positionierung der Fettsäure im aktiven Zentrum verantwortlich (Thuresson *et al.*, 2001, Garscha und Oliw, 2009). Dieses Valin ist in den Sequenzen der PGHS-1, PGHS-2, 7,8-LDS und PpoA konserviert. Anstelle des Valins besitzt PpoC an dieser Position ein Leucin (siehe Abb. 9A).

Der partielle Aminosäuresequenzvergleich der mutmaßlichen Cytochrom-P450-Domäne von PpoA und PpoC mit Sequenzen anderer Ppo-Enzyme sowie charakterisierter Cytochrom-P450-Enzyme zeigt, dass auch in dieser Domäne mehrere Aminosäurereste in allen Sequenzen konserviert sind. Insbesondere ist das EXXR-Motiv, das zu den am stärksten konservierten Sequenzmotiven von Cytochrom-P450-Enzymen gehört, in allen Sequenzen konserviert (siehe Abb. 9B). Ein weiteres wichtiges konserviertes Sequenzmotiv stellt das Häm-Bindungssignatur-Motiv dar, für das die folgende Konsensus-Sequenz in der PROSITE-Datenbank beschrieben ist (vgl. hierzu auch <http://www.expasy.org/cgi-bin/nicedoc.pl?PDOC00081>):

[FW] - [SGNH] - x - [GD] - {F} - [RKHPT] - {P} - C - [LIVMFAP] - [GAD]

Der Aminosäuresequenzvergleich zeigt, dass alle Aminosäuren des Häm-Bindungssignatur-Motivs von PpoA mit denen der Konsensus-Sequenz übereinstimmen. Im Gegensatz hierzu erscheint die Aminosäuresequenz des Häm-Bindungssignatur-Motivs von PpoC nicht mit der oben beschriebenen Konsensus-Sequenz übereinzustimmen. Insbesondere ist das Cystein, welches als der fünfte Häm-Eisen-Ligand in allen Cytochrom-P450-Enzymen fungiert (Meunier *et al.*, 2004), nicht in der PpoC-Aminosäuresequenz konserviert. An Stelle eines Cysteins besitzt PpoC an dieser Position ein Glycin (siehe Abb. 9B).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass PpoA und PpoC eine konservierte N-terminale Fettsäure-Häm-Peroxidase/Dioxygenase-Domäne besitzen, wie sie bereits für PGHS und 7,8-LDS bekannt ist. Während PpoA im C-terminalen Bereich der Aminosäuresequenz eine konservierte Cytochrom-P450-Domäne besitzt, erscheint diese im Falle von PpoC nicht konserviert zu sein.

### A N-terminale Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne

<i>A. nidulans</i> _PpoC	YQYRSADGSNNPTLPWLGAANTAYARSIEPLTVQPGGLPDAGLVFDTLFAQQ--KFTPH	237
<i>A. nidulans</i> _PpoA	SMHRKADGSGNNRFPWQLGAAGSAYARSVRPKTMQSPSLPDPETIFDCLLRK--EYREH	185
<i>G. graminis</i> _7,8-LDS	FSFREPDGSGNNIHLPSLGAANTPYARSTKPLVFQNFNPPDPATIFDTLMVRDPAKFRFH	186
<i>O. aries</i> _PGHS-1	YISWESFS---NVSYYTRILPSPVKDCPTPMGTGKQKQLPDVQLLAQQLLR--EFIPA	192
<i>O. aries</i> _PGHS-2	YKSWEAFS---NLSYYTRALPPVADDCPTPMGVKGNKELPDSKEVLEKVLRR--EFIPD	176
<i>A. nidulans</i> _PpoC	PNKVSSLFFDWASLIIEHDFIQTDYRDYN--KNKTSAYLDLAILYGDVQEEQDLVTRHKDG	295
<i>A. nidulans</i> _PpoA	PNKISSVLFYLASIIIEHDLFQTDPKDNS--VSKTSSYLDLSPLYGNQDEQNLVTRFKDG	243
<i>G. graminis</i> _7,8-LDS	PNKISSMLFYLATIIEHDFIQTSRDFN--INLTSSYLDLSPLYGRNHDEQMAVRTGKDG	244
<i>O. aries</i> _PGHS-1	PQGTNILFAFFAQHFTHQFFFKTSGKMGPGFTKALGHGVDLGHIIYGDNLERQYHLRLFKDG	252
<i>O. aries</i> _PGHS-2	PQGSMMFAFFAQHFTHQFFFKTDHKKRPGFTRGLGHGVDLNHIYGETLDRQHKLRFLFKDG	236
<i>A. nidulans</i> _PpoC	KLKPDSPS-----EPRLQAFPAACVLLVMLNRFHNYVVEELAAINENGRFTKPS	345
<i>A. nidulans</i> _PpoA	KLKPDSCFA-----TKRVLGFPFPGVGVLLIMFNRFHNYVVDQLAAINECGRFTKFP	292
<i>G. graminis</i> _7,8-LDS	LLKPDTFSS-----SKRVI GFPPGVGAFLLIMFNRFHNYVVTQLAKINEGGRFKRP	293
<i>O. aries</i> _PGHS-1	KLKYQVLDGEVYPPSVEQASVLMRYPPGVPPERQMAVGQEVFGLLPGLMLFSTIWLREHN	312
<i>O. aries</i> _PGHS-2	KLKYQVIGGEVYPPVTKDTQVEMIIYPPHIIENLQFAVGQEVFGLVPLMMYATTIWLREHN	296
<i>A. nidulans</i> _PpoC	PDLPEEQAKKAWAKYDEDLFQTRGLITCGLFINITLYDYVRTIVNLNRVNSTWCLDPRQ	405
<i>A. nidulans</i> _PpoA	---DESNVDEYAKYDNNLFQTRGLVTCGLYANIILKDYVRTIILNINRTDSTWCLDPRME	348
<i>G. graminis</i> _7,8-LDS	---TTPDDTAGWETYDNLFLQTRGLITCGLYINIVLGDYVRTIILNLRANTTWLNDPRTK	350
<i>O. aries</i> _PGHS-1	-RVCDDLKKEHPTWDDEQLFQTRRLILIGETIKIVIEEYVQHLS---GYFLQLKFDPELL	368
<i>O. aries</i> _PGHS-2	-RVCDDLKQEHPEWGDEQLFQTRRLILIGETIKIVIEDYVQHLS---GYHFKLKFDPELL	352
<i>A. nidulans</i> _PpoC	MEG---SAT-PAGLGNQCSVEFNLAIRWISASISANDEKWKTEKVEELI-GKPGSEISTQE	460
<i>A. nidulans</i> _PpoA	MKDGLLGEAAAMATGNQVSAEFNVVIRWISACISKRDEKWTEDFHREIMPGVDPSLTSMQD	408
<i>G. graminis</i> _7,8-LDS	EGKSLLSKPTPEAVGNQVSEFNLIIRWISACTISERDDKWTNAMREALGGQDPATAKMD	410
<i>O. aries</i> _PGHS-1	FRA-----QFYQRNRIAMEFNHLIIRWISPLMPNSFQ-----VGSQEYSYEQ	408
<i>O. aries</i> _PGHS-2	FNQ-----QFYQNRRIASEFNTLIIRWISPLLPDFTN-----IEDQEYSFKQ	392
<i>A. nidulans</i> _PpoC	LLMGLGKYGASLPKDPQSRTFAGLKRQEDGTFKDEELVNILTSAIEDVAGSFGARNVPKV	520
<i>A. nidulans</i> _PpoA	FVAGLGRWQAGLPQEPLEPFGSLQKRPDGAFFNDDLVNLFKESVEDCAGAFGASHVPAI	468
<i>G. graminis</i> _7,8-LDS	VMRALGMFEKNIIPDEPEKRTLGLTRQSDGAFDDTELVKILQESIEDVAGAFGNHVPAC	470
<i>O. aries</i> _PGHS-1	FLFNT----SMLVDYGEALVDAFSRQRAGRIG-----GGRNFDYH	445
<i>O. aries</i> _PGHS-2	FLYNN----SILLEHGLTQFVESFTRQIAGRVA-----GGRNVPIA	429

### B C-terminale Cytochrom-P450-Domäne

<i>A. nidulans</i> _PpoA	YFMEGARLRS--SVALPRVAAQPTVVEDNGE-KLTIKAGQVVMCNLVSACMDPTAF--PDPEKVKL	989
<i>A. nidulans</i> _PpoC	YALEAIRLNA--GSGAYRKAETNFYFKGEDA-DINLKPGEFISSTQANRDPDTAF--PDPDEVRL	
<i>A. fumigatus</i> _1	YCMEAIRLNG--IFGSYRKSQTNLTLDKGG-KVHIKAGDNVFSFIDANRDPDVF--PKPEEVDL	
<i>A. fumigatus</i> _2	YCMEAIRLNG--IFGSYRKSQTNLTLDKGG-KVHIKAGDNVFSFIDANRDPDVF--PKPEEVDL	
<i>A. niger</i> _1	YVLEAQRLLTS--MECTVVRVCKAHTIN----DQEFKPGDVVITLLGPAACRDPTSI--PDAETFKL	
<i>A. niger</i> _2	YFMEGARLRS--SVGLPRLVAKPTVVDDGGS-KYTLKPGQSVLCLNLSASMDPRSF--PEPEKVKL	
<i>CYP450</i> _119	AIEEALRYSPP--VMTRVKTKERVKLG----DQTIEEGEYVRVVIASANRDEEVF--HDGEKFI	
<i>CYP450</i> _cin	AIEEALRFYG--PAMVGRVLTQEVTVG----DITMKPGQTAMLWFPIASRDRSAF--DSPDNIVI	
<i>CYP450</i> _130	AVEELLRLTSP--VQGLARTTRDVTIG----DTTIPAGRRVLLLYGSANRDERQYG--PDAEELDV	
<i>CYP450</i> _nor	FVEELCRYHTASALAKRTAKEDVMIG----DKLVRANEGIIASNQSANRDEEVFENPDEFNMNR	
<i>CYP450</i> _3A4	VVNETLRLFP--IAMRLERVCKDVEIN----GMFIPKGVVMIIPSYALHRDPKYW--TEPEKFLP	
<i>CYP450</i> _2C9	VVHEVQRYIDLLPTSLPHAVTCDIKFR----NYLIPKGTTLISLTSVLHDNKEF--PNPEMFDP	

#### EXXR-Motiv

<i>A. nidulans</i> _PpoA	DRDMNL-----YAHFGFGPHKCLGLDLCKTGLSTMLKVLGR-LDNLRRAPGAQGGQLKLSGP	1045
<i>A. nidulans</i> _PpoC	DRPDES-----YLNIGIGSQIGLGDATLTAVTAMVRAAFS-LEGLRPAPGVQGLKVVVRP	
<i>A. fumigatus</i> _1	NRPMS-----YIHYGVGPHTCGLGSEASKVALTTLRVVGR-LDNLRRAPGAQGGELKKIIPRE	
<i>A. fumigatus</i> _2	NRPMS-----YIHYGVGPHTCGLGSEASKVALTTLRVVGR-LDNLRRAPGAQGGELKKIIPRE	
<i>A. niger</i> _1	DRPSNA-----YIHFGYGAHECLGKEIGLTFAVSMLRVLAG-LKYLRPAPGDMGLKSIIVD	
<i>A. niger</i> _2	DRDMSL-----YAHFGFGPHQCLGMGICKLALTTLRVVGR-LDNLRRAPGSGQGLKKIAGP	
<i>CYP450</i> _119	DRPNP-----HLSFGSGIHLCLGAPLARLEARIAIEEFSKRFRHIEILDTEKVPNEVLNGY	
<i>CYP450</i> _cin	ERTPNR-----HLSLGHGIIHRCGLGAHLIRVEARVAITEFLKRIPEFSLDPNKEEWLMGQVA	
<i>CYP450</i> _130	TRCPRN-----ILTFSHGAHHCGLAAAARMQCRVALTELLARCPDFEVAESRIVWSGGSYVR	
<i>CYP450</i> _nor	KWPPQD-----PLGFGFGDHRCTAEHLAKAELTTFVSTLYQKFPDLKVAVPLGKINYPPLNR	
<i>CYP450</i> _3A4	ERFSKKNKNDIDPIYITPFGSGPRNCIGMRFALNMMLKALIRVLQ---NFSFKPKCKETQIPLKLSL	
<i>CYP450</i> _2C9	HHFLDEGGNFKSKYFMPFSAGKRICVGEALAGMELFLFLTSILQNFNLKSLVDPKNLDTTPVNG	

#### Häm-Bindungssignatur-Motiv

**Abb.9. Partieller Aminosäuresequenzvergleich von PpoA und PpoC.** A. Vergleich der Fettsäure-Häm-Peroxidase/Dioxygenase-Domäne von PpoA (AAR88626) und PpoC (AAT36614) mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen von *G. graminis* 7,8-LDS (Q9UUS2.1), *O. aries* PGHS-1 (P05979.2) und *O. aries* PGHS-2 (P79208.1). Das katalytische Tyrosin sowie das distale und proximale Histidin, das in allen fünf Sequenzen konserviert ist, ist schwarz schattiert. Darüber hinaus ist das konservierte Valin/Leucin schwarz

schattiert. B. Vergleich der Cytochrom-P450-Domäne von PpoA und PpoC mit den entsprechenden Aminosäuresequenzen von Cytochrom-P450-Enzymen [CYP450\_119 (1F4T:B), CYP450\_cin (1T2B:B), CYP450\_130 (2UUQ:A), CYP450\_nor (1JFB:A), CYP4503A4 (1TQN:A), CYP4502C9 (1R9O:A)] und verschiedenen anderen Ppo-ähnlichen Enzymen [*A. fumigatus* 1 (EDP50447), *A. fumigatus* 2 (ABV21632.1), *A. niger* 1 (XP\_001395220), *A. niger* 2 (XP\_001401954)]. Aminosäuren, die mit der bekannten Cytochrom-P450-Konsensus-Sequenz ([FW] - [SGNH] - x - [GD] - {F} - [RKHPT] - {P} - C - [LIVMFAP] - [GAD]) übereinstimmen, sind grau schattiert (vgl. hierzu <http://www.expasy.org/cgi-bin/nicedoc.pl?PDOC00081>). Außerdem sind das essentielle Cystein, das als fünfter Häm-Eisen-Ligand fungiert, schwarz sowie das EXXR-Motiv grau schattiert. Der Aminosäuresequenzvergleich wurde mit dem ClustalW-Algorithmus berechnet (Thompson *et al.*, 1994).

## **3.2 Biochemische Charakterisierung von PpoA**

### **3.2.1 Klonierung und Expression von PpoA**

*PpoA* wurde bereits im Rahmen der vorangegangenen Examensarbeit erfolgreich in den pET24a-Vektor kloniert (Brodhun, Staatsexamen 2006). Die Sequenzierung des Plasmids (siehe 2.3.5) bestätigte den offenen Leserahmen mit 3246 Basenpaaren (bp) und 1081 Aminosäuren, von denen allerdings drei Aminosäuren nicht mit denen der publizierten Genom-Sequenz übereinstimmten (Galagan *et al.*, 2005): Lys-166 ist durch Pro, Asp-417 durch Arg und Ile-859 durch Val substituiert.

Im Zuge der Examensarbeit wurde der *E. coli*-Stamm BI21Star als für die Expression geeigneter Stamm identifiziert. Weiterhin konnten optimale Kultivierungsbedingungen (28 °C, 18 h) bestimmt werden. Die PpoA-Expression wurde über SDS-PAGE (siehe 2.3.11) nachgewiesen und Aktivitätstests wurden mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode (siehe 2.3.15) durchgeführt. Durch die Zugabe von 0,1 mM  $\delta$ -Aminolävulinsäure und Eisenammoniumcitrat zum Zeitpunkt der Proteininduktion mit IPTG konnte die Expression erhöht werden (Daten nicht gezeigt).  $\delta$ -Aminolävulinsäure wird im ersten Schritt der Häm-Biosynthese aus Succinyl-CoA und Glycin gebildet. Die Zugabe von  $\delta$ -Aminolävulinsäure sollte damit diese Komponente als für die PpoA-Expression limitierenden Faktor ausschließen. Darüberhinaus sollte die Zugabe von Eisenammoniumcitrat gewährleisten, dass genügend Eisen für die Häm-Biosynthese zur Verfügung steht.

Versuche, PpoA mit einer C-terminalen oder N-terminalen Hexahistidin-Sequenz sowie als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase (GST) oder dem Maltose-bindenden-Protein (Mbp) zu exprimieren, führten lediglich zur Expression inaktiver Enzyme (Brodhun, Staatsexamen 2006).

### 3.2.2 Proteinreinigung

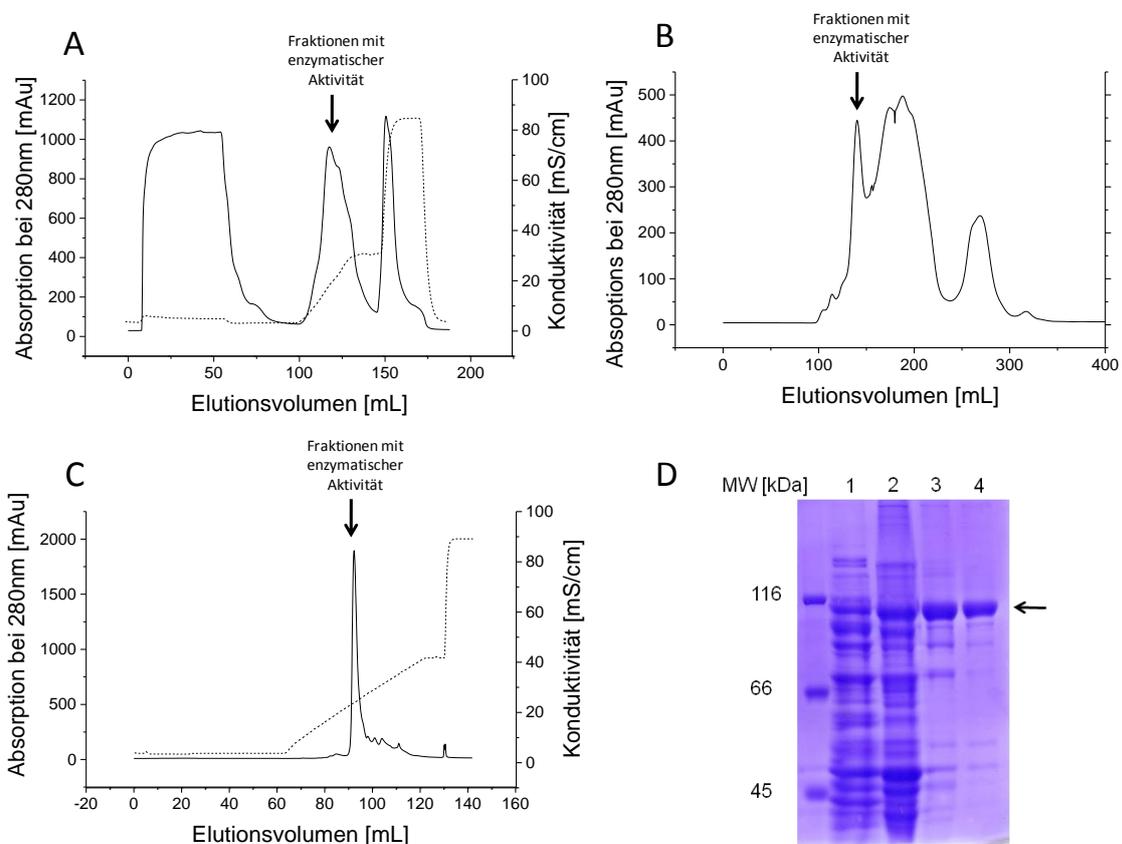
PpoA wurde aus den *E. coli*-Expressionszellen mit Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,6) extrahiert. Dieser Puffer enthielt 10 % (v/v) Glycerin, 5 mM EDTA und 0,2 mM PMSF enthielt (siehe 2.3.9). Diese Zusätze wurden gewählt, um die Proteinextraktionseffizienz zu erhöhen. Während Glycerin die Proteinstabilität positiv beeinflussen kann, ist bekannt, dass EDTA und PMSF die Aktivität von im Zellextrakt befindlichen Proteasen hemmen.

Für den ersten Reinigungsschritt wurde die Ionenaustauschchromatographie gewählt, deren Auftrennungsprinzip auf elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen der geladenen Proteinoberfläche und der entgegengesetzten Ladung der Säulenmatrix beruht (siehe 2.3.10.1). Es zeigte sich, dass PpoA, welches einen theoretischen isoelektrischen Punkt von pH 5,8 besitzt, in dem gewählten Aufschlusspuffer bei pH 7,6 an die Source30Q-Matrix (25 mL in XK 16/20) bindet. Nachdem die Säule mit Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,6) gewaschen wurde und nicht bzw. nur schwach bindende Proteine eluierten, wurden die gebundenen Proteine mit einem Gradienten steigender NaCl-Konzentration (Steigung 0,86 (mS/cm)/mL) von der Säule eluiert. Anschließend wurden die gesammelten Fraktionen auf enzymatische Aktivität mit Hilfe der Sauerstoffelektrode getestet (siehe 2.3.15.2) und mittels SDS-PAGE (siehe 2.3.11) analysiert (siehe Abb. 10D). Ein repräsentatives Elutionsprofil ist in Abb. 10A dargestellt. Obwohl bei diesem ersten Reinigungsschritt, ca. 60 % der PpoA-Aktivität verloren gingen, konnte eine 4-fache Proteianreicherung erreicht werden (siehe Tab. 3.)

Als zweiter Reinigungsschritt diente die Größenausschlusschromatographie oder auch Gelfiltrationschromatographie genannt (siehe 2.3.10.2). Bei dieser Technik werden Proteine anhand ihrer Größe bzw. ihres Molekulargewichtes aufgetrennt. Da die Auftrennung verschieden großer Proteine hierbei unter anderem durch das Volumen der Probe beeinflusst wird, wurden die Fraktionen mit der höchsten enzymatischen Aktivität (getestet an der Sauerstoffelektrode, siehe 2.3.15.2) und höchsten Reinheit (analysiert über SDS-PAGE, siehe 2.3.11) aus dem vorangegangenen Reinigungsschritt vereinigt und auf ein Volumen von 2-4 mL konzentriert, bevor sie auf die Gelfiltrationssäule geladen wurden. Die Größenausschlusschromatographie erfolgte in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,6). Auf diese Weise konnte PpoA von großen und kleinen Proteinaggregaten getrennt und zudem in einen Puffer mit niedrigem Salzgehalt überführt werden. Ein repräsentatives Elutionsprofil ist in Abb. 10B dargestellt. Anschließend wurden die Fraktionen wiederum an der Sauerstoffelektrode auf enzymatische Aktivität (siehe 2.3.15.2) überprüft und über SDS-PAGE (siehe 2.3.11) analysiert. Es zeigte sich, dass die meisten Verunreinigungen mit dieser Technik entfernt werden konnten (siehe Abb. 10D) und dass die Proteinausbeute 28 % betrug (siehe Tab. 3).

Für den letzten Reinigungsschritt, der dazu diente, verbleibende Verunreinigungen zu entfernen, wurde abermals die Ionenaustauschchromatographie gewählt. Die Reinigung erfolgte mit einer

MonoQ-Säule (siehe 2.3.10.3). Hierbei handelt es sich, wie bei der Source30Q, ebenfalls um einen Anionenaustauscher. Allerdings ist die Partikelgröße dieser Matrix wesentlich kleiner als bei der Source30Q, so dass die Bindungsstärke und Bindungskapazität erhöht ist. Die vereinigten Fraktionen aus dem vorangegangenen Reinigungsschritt wurden direkt auf die Säule geladen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten steigender NaCl-Konzentration (Steigung 0,86 (mS/cm)/mL). Ein repräsentatives Elutionsprofil ist in Abb. 10C gezeigt. Dieser Reinigungsschritt führte zu einer 62-fachen Anreicherung des Proteins und einer Ausbeute von 27 % (siehe Tab. 3). Mit diesem Protokoll konnten etwa 3-6 mg PpoA aus 1 L *E. coli*-Expressionskultur isoliert werden. Das gereinigte Protein wurde für die folgenden Experimente verwendet.



**Abb.10. Reinigung von rekombinantem PpoA-Protein.** A. Elutionsprofil des ersten Reinigungsschritts mittels Source30Q-Matrix (Anionenaustauscher). PpoA exprimierende *E. coli*-Zellen wurden in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,6 mit 10 % (v/v) Glycerin und 5 mM EDTA; siehe 2.3.9) aufgeschlossen, zentrifugiert und anschließend auf die Source30Q-Matrix geladen. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten (Steigung 0,86 (mS/cm)/mL). B. Elutionsprofil der Größenausschlusschromatographie. Fraktionen mit enzymatischer Aktivität wurden vereint, konzentriert und auf eine Superdex-S200pg-Säule geladen. Die Trennung der Proteine erfolgte in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,6). C. Elutionsprofil des letzten Reinigungsschritts mit einer MonoQ-Säule (Anionenaustauscher). Fraktionen mit enzymatischer Aktivität aus dem vorangegangenen Reinigungsschritt wurden auf eine MonoQ-Säule geladen. Die Elution erfolgte mit einem NaCl-Gradienten (Steigung 0,86 (mS/cm)/mL). D. SDS-PAGE-Analyse (siehe 2.3.11) der nach jedem Reinigungsschritt vereinten Fraktionen: 1. Zelleextrakt, 2. nach Source30Q-Säule, 3. nach Superdex-S200pg-Säule, 4. nach MonoQ-Säule. Bei den Abbildungen handelt es sich um ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei verschiedenen Enzympräparationen.

**Tab.3: Reinigung von rekombinantem PpoA-Protein.**

Reinigungsschritt	Gesamtprotein <sup>a</sup> [mg]	Spezifische Aktivität <sup>b</sup> [ $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ ]	Ausbeute [%]	Anreicherungsfaktor
Zellextrakt	822	0,051	100	1
Source 30Q	64,8	0,215	33	4
S200 26/60	8	1,47	28	28
MonoQ 10/10	3,6	3,2	27	62

<sup>a</sup> Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode von Bradford (1976) mit BSA als Standard bestimmt (siehe 2.3.12).

<sup>b</sup> Die spezifische Aktivität wurde mit Hilfe der Sauerstoffelektrode bestimmt (siehe 2.3.15.2). Der initiale Sauerstoffverbrauch wurde für die Reaktion mit 100  $\mu\text{M}$  des Natriumsalzes von 18:2 <sup>$\Delta 9Z,12Z$</sup>  ermittelt. Das dargestellte Reinigungsprotokoll ist repräsentativ für mindestens drei verschiedene Enzympräparationen.

### 3.2.3 Molekulare Masse und oligomere Struktur von PpoA

Bei der Reinigung von PpoA wurden nach jedem Reinigungsschritt die Fraktionen mit enzymatischer Aktivität mittels SDS-PAGE analysiert. Hierbei wurde nach jedem Reinigungsschritt ein Protein-Signal mit einem Molekulargewicht von 110 kDa nachgewiesen. Der letzte Reinigungsschritt mittels MonoQ führte zu einem reinen Protein, in dem lediglich Spuren von Verunreinigungen detektiert werden konnten (siehe Abb. 10D). Die mittels SDS-PAGE bestimmte molekulare Masse von PpoA von 110 kDa ist damit etwas geringer als die theoretisch berechnete molekulare Masse von 120 kDa. Die Analyse der molekularen Masse über die Gelfiltrationssäule deutete auf eine molekulare Masse von ca. 440 kDa hin und ist damit 4-mal so hoch wie der über SDS-PAGE bestimmte Wert. Dieses Ergebnis zeigt, dass unter den verwendeten Bedingungen PpoA als homotetramerer Proteinkomplex vorlag.

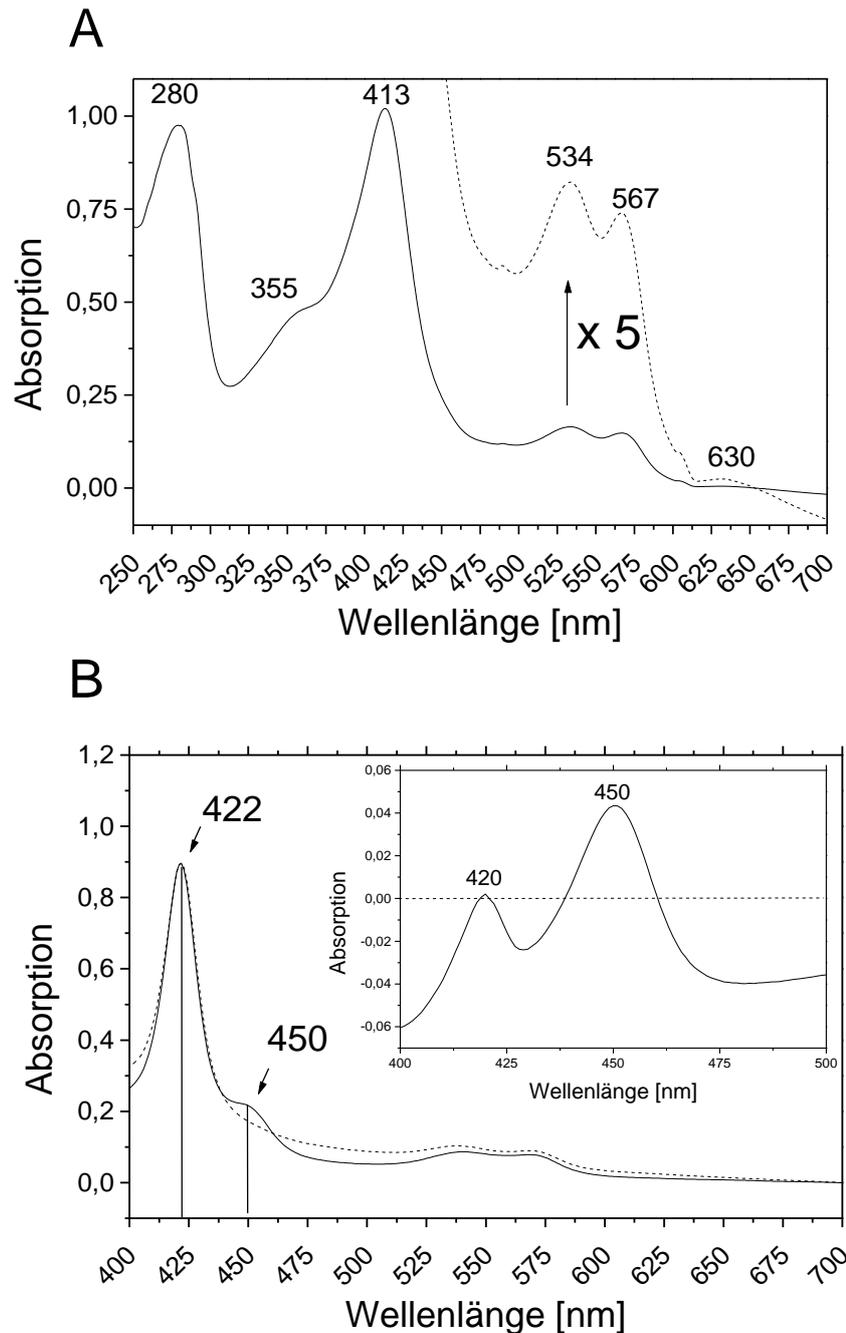
### 3.2.4 Spektroskopische Analysen und prosthetische Gruppen

Mit den folgenden Analysen sollten die spektroskopischen Eigenschaften von gereinigtem PpoA untersucht werden, um Aussagen über gebundene Kofaktoren treffen zu können.

#### 3.2.4.1 UV/vis-Analyse

Ein UV/vis-Spektrum von gereinigtem PpoA ist in Abb. 11A dargestellt und zeigt Signale, die charakteristisch für Häm-Proteine sind. Die höchsten Absorptionsmaxima sind bei 280 nm und 413 nm ( $\gamma$ , Soret-Bande) sichtbar. Außerdem sind Signale bei 534 nm ( $\beta$ ), 567 nm ( $\alpha$ ), 355 nm ( $\delta$ ) und 630 nm erkennbar. Die Signale bei 413 nm und 630 nm deuten auf einen high-spin-Häm-Eisen(III)-Komplex hin.

Um die Präsenz der postulierten Cytochrom-P450-Domäne prinzipiell zu analysieren, wurde PpoA mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  reduziert und mit CO inkubiert (siehe 2.3.16.1). Ein UV/vis-Spektrum des reduzierten Proteins und des reduzierten Häm-CO-Komplexes ist in Abb. 11B dargestellt. Das durch  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  reduzierte PpoA wies eine bathochrome Verschiebung des Soret-Maximums von 413 nm nach 422 nm auf. Die Inkubation des reduzierten Komplexes mit CO führte zu der Bildung eines zusätzlichen transient gebildeten Signals bei 450 nm, wie es auch in dem Differenzspektrum erkennbar ist (Abb. 10B, Einsatz). Die Bildung eines reduzierten Häm-CO-Komplexes mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm ist eine charakteristische Eigenschaft von Cytochrom-P450-Enzymen (Omura und Sato, 1964a, Omura und Sato, 1964b) und ist maßgeblich für deren Namensgebung verantwortlich (Coon, 2005). Im Falle von PpoA erschien der gebildete Komplex sehr instabil zu sein und zerfiel innerhalb weniger Minuten zu einer Spezies, die als P420-Komplex bekannt ist und bereits für mehrere Cytochrom-P450-Enzyme, wie beispielsweise P450<sub>bisd</sub> aus *Sphingomonas sp.* (Sasaki *et al.*, 2005) oder die PGIS aus *Homo sapiens* (Yeh *et al.*, 2005) beschrieben wurde. Die schwachen Signale des reduzierten CO-Komplexes bei 450 nm und 420 nm deuten auf eine unvollständige Reaktion hin. Ähnliche Beobachtungen wurden auch für andere Cytochrom-P450-Enzyme, wie beispielsweise die AOS aus *Tulipa gesneriana* gemacht (Lau *et al.*, 1993).



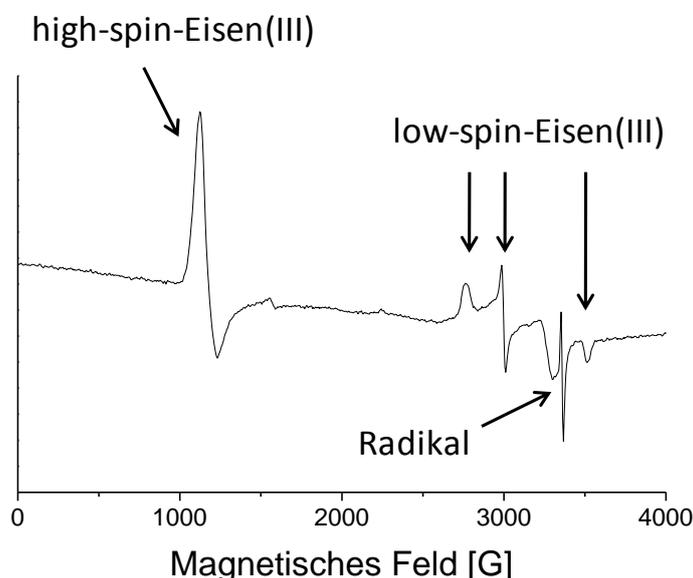
**Abb.11. Spektrale Analyse von PpoA.** A UV/vis-Spektrum von rekombinantem PpoA in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4; siehe 2.3.16.1). Das UV/vis-Spektrum zeigt Absorptionsmaxima bei 280 nm ( $\gamma$ , Soret) und kleinere Maxima bei 355 nm ( $\delta$ ) 534 nm ( $\beta$ ), 567 nm ( $\alpha$ ) und 630 nm. Die gepunktete Linie zeigt eine 5-fache Vergrößerung des Spektrums. B. UV/vis-Spektrum des mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  reduzierten Häm-CO-Komplexes von PpoA. Das Spektrum wurde wie in 2.3.16.1 und bei Omura & Sato beschrieben erhalten (Omura und Sato, 1964b). Das Spektrum des mit  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  reduzierten PpoA (feste Linie) zeigt ein Soret-Maximum bei 422 nm. Die anschließende Inkubation mit CO (gepunktete Linie) führte zur transienten Bildung eines Signals bei 450 nm, das im Differenzspektrum (Einsatz) als Maximum zu erkennen ist. Der reduzierte Häm-CO-Komplex war instabil und zerfiel zu einer Spezies, die als P420 bezeichnet wird und ein Maximum bei 420 nm aufweist, wie ebenfalls im Differenzspektrum erkennbar. Das UV/vis-Spektrum des nativen Proteins stellt ein repräsentatives Ergebnis dar, das von mindestens drei unabhängigen Enzympräparationen erhalten wurde.

### 3.2.4.2 ESR-Analyse

Die spektroskopischen Daten der ESR-Analyse wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Alistair Fielding im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von PD Dr. Marina Bennati (Max Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) erhalten. In Abb. 12 ist ein ESR-Spektrum von 250  $\mu\text{M}$  PpoA in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) dargestellt. Das Spektrum wurde bei 9,4 GHz und 4 K aufgenommen (siehe 2.3.16.3). Es zeigt sowohl deutliche Signale für einen high-spin-Häm-Eisen(III)-Komplex mit einer Resonanz bei  $g = 6,0$  und einen low-spin-Häm-Eisen(III)-Komplex mit Resonanzen bei  $g = 2,44$  und  $2,25$  sowie  $1,91$ . Außerdem ist ein Signal bei  $g \sim 2$  erkennbar, das auf die Präsenz eines konstitutiven freien organischen Radikals hindeutet.

Der erhaltene  $g$ -Faktor von  $6,0$  ist charakteristisch für high-spin-Häm-Eisen(III)-Komplexe, wie sie in Fettsäure-Häm-Dioxygenasen/Peroxidasen, wie z.B. den PGHS, bekannt sind. Diese besitzen Häm-Eisen, das über fünf Liganden koordiniert ist. Dabei entstammen vier Bindungsstellen dem Porphyrin, während es sich bei dem fünften Liganden zumeist um ein Histidin handelt.

Die erhaltenen  $g$ -Faktoren von  $2,44$  und  $2,25$  sowie  $1,91$  sind charakteristisch für low-spin-Häm-Eisen(III)-Komplexe, wie sie für Cytochrom-P450-Enzyme beschrieben sind. Diese besitzen Häm-Eisen, das über sechs Liganden kovalent gebunden ist. Vier Koordinationsstellen entstammen dem Porphyrin, während es sich bei dem fünften Liganden um das in Cytochrom-P450-Enzymen hoch konservierte Cystein handelt. Bei dem sechsten Häm-Eisen-Liganden handelt es sich zumeist um Wasser oder Hydroxid.

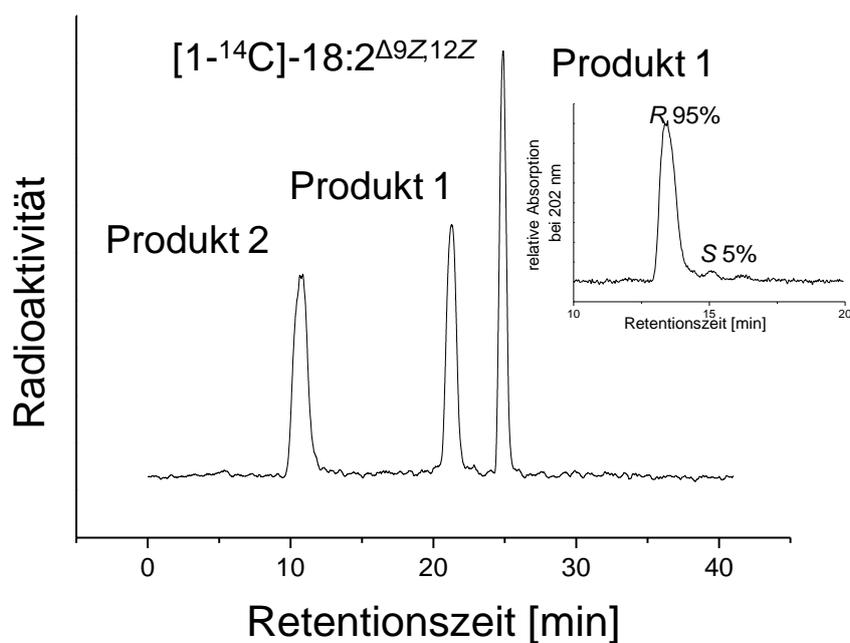


**Abb.12. ESR-Spektrum von 250  $\mu\text{M}$  PpoA in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4).** Es zeigt sich ein Signal mit  $g = 6,0$ , das charakteristisch für einen high-spin-Häm-Eisen(III)-Komplex ist, wie er in Fettsäure-Häm-Dioxygenasen/Peroxidasen (z.B. PGHS) vorkommt. Außerdem sind Signale bei  $g = 2,44$  und  $2,25$  sowie  $1,91$  zu erkennen, die charakteristisch für einen low-spin-Häm-Eisen(III)-Komplex sind, wie er in Cytochrom-P450-Enzymen vorkommt. Das Spektrum wurde bei 9,4 GHz und 4 K mit einer Amplitudenmodulation von 4 G und einer Mikrowellenleistung von 1 mW aufgenommen (siehe 2.3.16.3). Das dargestellte ESR-Spektrum ist ein repräsentatives Ergebnis, das mit mindestens drei verschiedenen Enzympräparationen erhalten wurde.

### 3.2.5 Produktidentifikation

#### 3.2.5.1 Analyse der gebildeten Produkte mittels Radio-HPLC

Für die Produktanalyse mittels Radio-HPLC-Trennung wurde zu einer 0,1 mM  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$ -Lösung 5,5 MBq  $[1-^{14}\text{C}]-18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  gegeben und mit 125 nM gereinigtem PpoA für 60 min schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Fettsäuren und deren Derivate wie in 2.3.13.1 beschrieben mit Diethylether extrahiert und über eine RP-HPLC mit einem Radiodetektor analysiert (siehe 2.3.14.2). Wie in Abb. 13 zu erkennen ist, konnten zwei unterschiedlich polare Produkte detektiert werden. Das weniger polare Produkt eluierte nach 21,4 min von der RP-Säule und ist als Produkt 1 in Abb. 13 gekennzeichnet. Das stärker polare Produkt eluierte hingegen nach 10,8 min und ist in Abb. 13 als Produkt 2 gekennzeichnet.



**Abb.13. Radio-HPLC- und CP-HPLC-Analyse der bei der Umsetzung von  $[1-^{14}\text{C}]-18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  bzw.  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  durch PpoA gebildeten Produkte.** 0,1 mM  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  versetzt mit 5,5 MBq  $[1-^{14}\text{C}]-18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  wurden mit 125 nM gereinigtem PpoA für 60 min schüttelnd in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) inkubiert und anschließend extrahiert (siehe 2.3.13.1). Als Einsatz ist das Ergebnis der CP-HPLC-Analyse von Produkt 1 nach der Umsetzung von  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  gezeigt (siehe 2.3.14.3). Die Elutionsprofile sind ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Messungen.

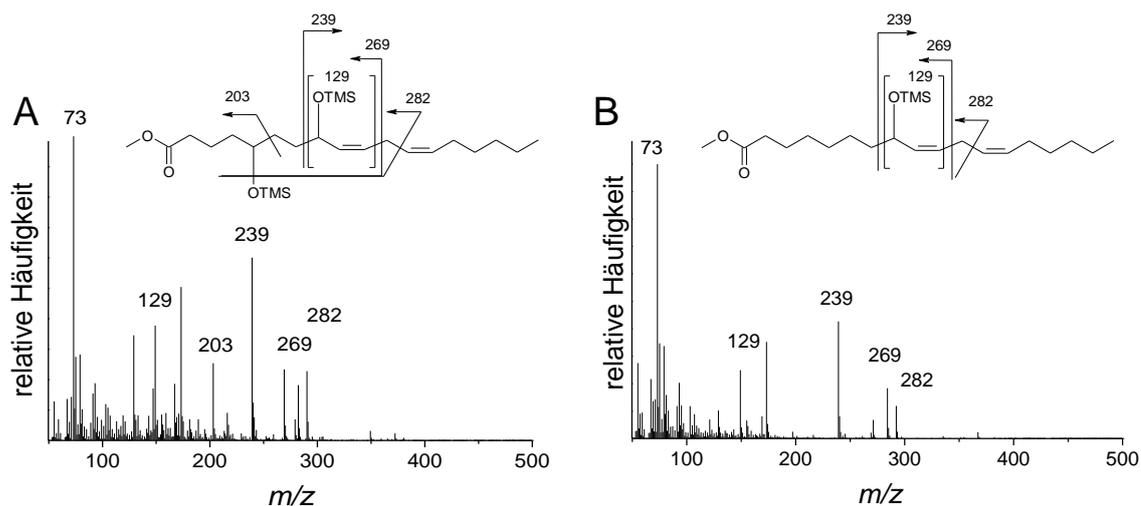
Die Mengen an Produkt 1 schwankten in den verschiedenen Experimenten stark. So wurden in manchen Experimenten nur Spuren an Produkt 1 detektiert, während in anderen Experimenten große Mengen hiervon nachgewiesen werden konnten. Zur besseren Veranschaulichung ist für die Abbildung 13 das Ergebnis eines Experiments gewählt worden, in dem die Mengen an Produkt 1 hoch waren.

Wurde Produkt 1, wie in 2.3.14.3 beschrieben, mit  $\text{SnCl}_2$  reduziert und anschließend mittels RP-HPLC analysiert (siehe 2.3.14.1), so zeigte das reduzierte Produkt 1 eine 0,6 min kürzere Retentionszeit als das nicht reduzierte Produkt 1 (Daten nicht gezeigt). Außerdem zeigte die sterische Analyse des reduzierten und nicht radioaktiv markierten Produkts 1 mittels CP-HPLC (2.3.14.3), dass es mit einer Spezifität von 95 % in *R*-Konfiguration gebildet wurde (Abb. 13, Einsatz).

### 3.2.5.2 Analyse der gebildeten Produkte mittels GC/MS

Die Struktur des Produkts 2 und des reduzierten Produkts 1 konnte mit Hilfe der GC/MS-Analyse bestimmt werden. Hierzu wurden die über RP-HPLC gereinigten Produkte wie in 2.3.13.3 beschrieben in ihre korrespondierenden Methylsilylether-Methylester-Derivate überführt und anschließend mittels GC/MS analysiert (siehe 2.3.14.4). Die EI-MS-Spektren beider Produkte sind in Abb. 14 mit den möglichen Fragmentationensignalen dargestellt. Das EI-MS-Spektrum von Produkt 2 zeigt die folgenden Fragmentationensignale:  $m/z$  129 ( $\text{CH}(\text{OSiCH}_3)_3\text{-C}_2\text{H}_5$ ), 203 (Spaltung zwischen C-5 und C-6), 239 (Spaltung zwischen C-7 und C-8), 269 (Spaltung zwischen C-10 und C-11) und 282 (Spaltung zwischen C-12 und C-13). Das Basis-Signal ist  $m/z$  73. Diese Daten zeigen, dass es sich bei dem Produkt 2 um ein  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$ -Derivat handelt, das zwei Hydroxy-Gruppen an Position C-5 und C-8 besitzt. Dieses Produkt wird im Folgenden als 5,8-DiHODE (5,8-Dihydroxy-9Z,12Z-octadecadiensäure) bezeichnet. Das EI-MS-Spektrum des reduzierten Produkts 1 zeigt ähnliche Fragmentationensignale wie das EI-MS-Spektrum von Produkt 2. Allerdings ist hier kein Signal mit  $m/z$  203 erkennbar. Dieses Ergebnis zeigt, dass es sich bei dem Produkt 1 um ein  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$ -Derivat handelt, das eine Hydroxy-Gruppe an Position C-8 trägt. Dieses Produkt wird im Folgenden als 8R-H(P)ODE (8-Hydro(peroxy)-9Z,12Z-octadecadiensäure) bezeichnet.

In vielen Experimenten, bei denen die Bildung von 5,8-DiHODE besonders hoch war, konnte ein zusätzliches Signal bei einer Retentionszeit von 18 min beobachtet werden konnte. Nach der Überführung dieses Produktes in das korrespondierende Methylsilylether-Methylester-Derivat (siehe 2.3.13.3) und GC/MS-Analyse (siehe 2.3.14.4) zeigte sich, dass dieses Produkt das gleiche EI-MS-Spektrum wie 5,8-DiHODE (Abb. 14A) besitzt. Dies zeigt, dass 5,8-DiHODE nicht enzymatisch durch eine intramolekulare Veresterung in ein 8-Hydroxy- $\delta$ -Lakton überführt werden kann. Es ist bekannt, dass derartige intramolekulare Esterbildungen leicht bei Hydroxy-Fettsäurederivaten entstehen, die eine Hydroxy-Gruppe in der  $\delta$ -Position bzw. am C-5 tragen, da der entstehende  $\text{C}_6$ -Ring nahezu spannungsfrei ist.



**Abb.14. EI-MS-Spektren sowie die möglichen Fragmentationmuster der Methylsilylether-Methylester-Derivate von 5,8-DiHODE (A) und 8R-HODE (B).** Die Produkte wurden wie in 2.3.14.1 beschrieben über RP-HPLC getrennt. Nachdem 8R-HPODE (Produkt 1) mit  $\text{SnCl}_2$  zu 8R-HODE reduziert worden war (siehe 2.3.14.3), wurden beide Produkte wie in 2.3.13.3 beschrieben in die korrespondierenden Methylsilylether-Methylester-Derivate überführt und mittels GC/MS analysiert (siehe 2.3.14.4). Es handelt sich um ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Messungen.

Mit Hilfe der GC/MS-Analyse wurde außerdem untersucht, welche Fettsäuren als Substrate für PpoA fungieren können. Von besonderem Interesse waren hier Fettsäuren, die auch endogen in *A. nidulans* vorhanden sind. Fettsäureprofile von *A. nidulans* zeigten, dass die endogenen Fettsäuren eine Kettenlänge von bis zu 18 Kohlenstoffatomen haben (Brodhun, Staatsexamen 2006). Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 16 und 18 Kohlenstoffatomen und mindestens einer Doppelbindung ( $16:1^{\Delta 9Z}$ ,  $18:1^{\Delta 9Z}$ ,  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$ ,  $18:3^{\Delta 9Z,12Z,15Z}$ ) wurden durch PpoA in die korrespondierenden 8-Hydro(pero)xy- und 5,8-Dihydroxy-Fettsäurederivate überführt, wie in Tab. 4 dargestellt.

**Tab.4: Produkte der Reaktion von PpoA mit verschiedenen ungesättigten Fettsäuren.** Für die Analyse wurden die Produkte durch Inkubationen mit PpoA (siehe 2.3.13.1) erzeugt und anschließend über RP-HPLC (siehe 2.3.14.1) isoliert. Die Produkte wurden in ihre entsprechenden Methylsilylether-Methylester-Derivate (siehe 2.3.13.3) überführt und mittels GC/MS analysiert (siehe 2.3.14.4). Es wurden mindestens drei unabhängige Messungen durchgeführt. H(P)HME, Hydro(pero)xy-9Z-hexadecensäure H(P)OME, Hydro(pero)xy-9Z-octadecensäure; H(P)ODE, Hydro(pero)xy-9Z,12Z-octadecadiensäure; H(P)OTE, Hydro(pero)xy-9Z,12Z,15Z-octadecatriensäure; DiHHME Dihydroxy-9Z-hexadecensäure DiHOME, Dihydroxy-9Z-octadecensäure; DiHODE, Dihydroxy-9Z,12Z-octadecadiensäure; DiHOTE, Dihydroxy-9Z,12Z,15Z-octadecatriensäure.

Substrate	Produkt 1	Produkt 2
$16:1^{\Delta 9Z}$	8-H(P)HME	5,8-DiHHME
$18:1^{\Delta 9Z}$	8-H(P)OME	5,8-DiHOME
$18:2^{\Delta 9Z,12Z}$	8-H(P)ODE	5,8-DiHODE
$18:3^{\Delta 9Z,12Z,15Z}$	8-H(P)OTE	5,8-DiHOTE

### 3.2.5.3 Analyse der gebildeten Produkte mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup>

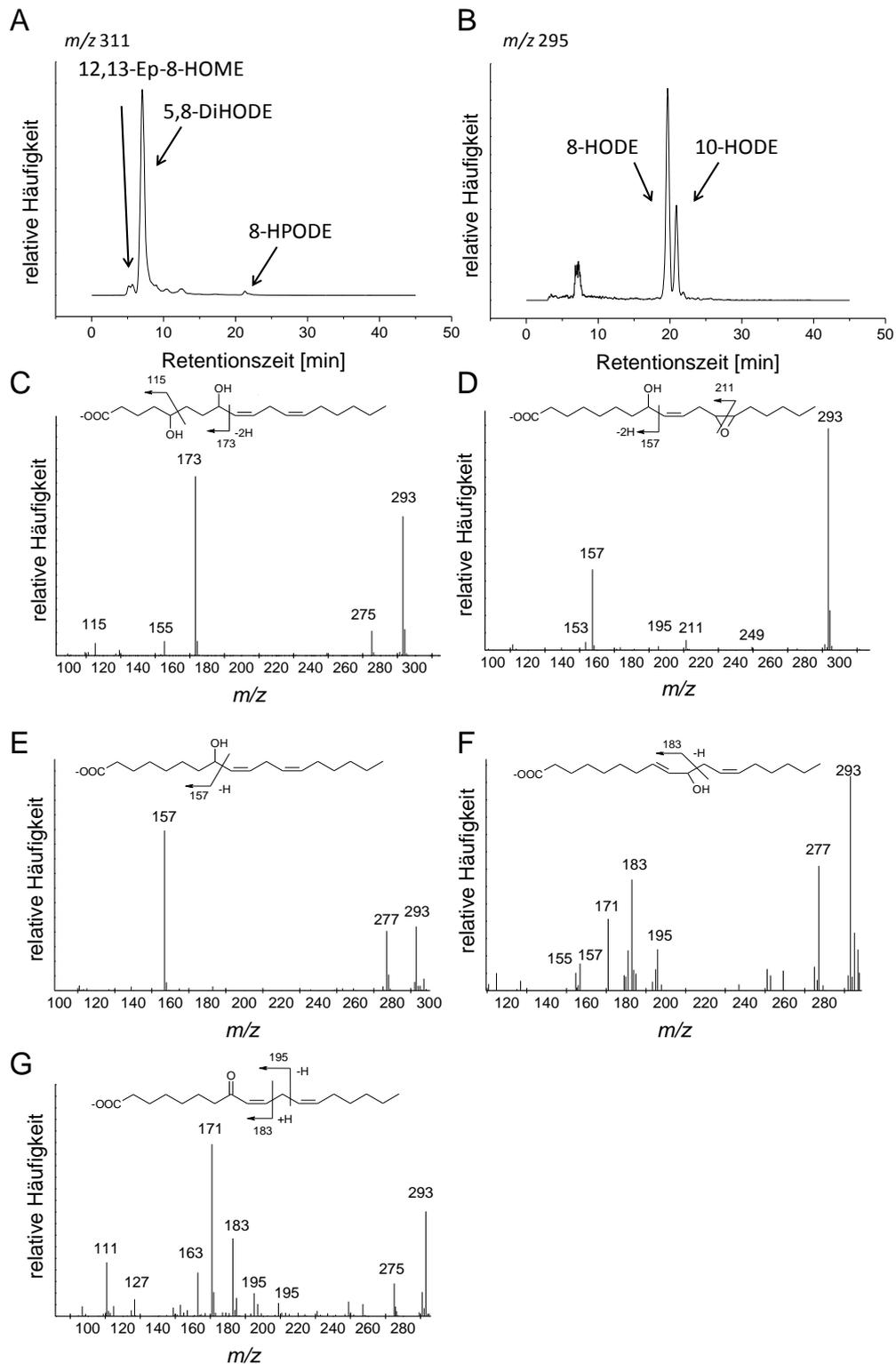
Um weitere Informationen über die von 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> und PpoA gebildeten Produkte zu erhalten, wurde die Produktanalyse zusätzlich mit Hilfe von RP-HPLC/MS<sup>2</sup>-Messungen durchgeführt. Hierfür wurde 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> mit PpoA wie in 2.3.13.1 beschrieben schüttelnd für 30 min inkubiert, mit Diethylether extrahiert und anschließend über RP-HPLC/MS<sup>2</sup> analysiert (siehe 2.3.14.5). Die auf  $m/z$  311 und 295 extrahierten Ionenchromatogramme sind in Abb. 15 mit den dazu gehörigen Tandem-MS-Spektren und möglichen Fragmentationenmustern dargestellt.

In Abb. 15A ist das auf  $m/z$  311 extrahierte Ionenchromatogramm für die Produktanalyse der Umsetzung von PpoA mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> abgebildet. Dieser  $m/z$ -Quotient entspricht der Summe aus dem Molekulargewicht von 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> zuzüglich zweier Sauerstoffatome und abzüglich eines Protons. Es zeigt sich ein starkes Signal bei einer Retentionszeit von 7 min. Das entsprechende Tandem-MS-Spektrum dieses Produkts ist in Abb. 15C dargestellt und weist ein Fragmentationenmuster auf, das charakteristisch für 5,8-DiHODE ist (Garscha *et al.*, 2007). Bei dem schwachen Signal mit einer Retentionszeit von 21,3 min handelt es sich um 8R-HPODE. Das Tandem-MS-Spektrum dieses Produkts weist nur das Signal eines Fragmentations aus, das durch die Abspaltung von Wasser entstanden und deshalb hier nicht dargestellt ist. Außerdem ist ein weiteres schwaches Signal mit einer Retentionszeit von 5,4 min erkennbar, dessen Tandem-MS-Spektrum in Abb. 15D dargestellt ist. Das Fragmentationenmuster ist identisch mit dem bereits beschriebenen Fragmentationenmuster von 12,13-Epoxy-8-hydroxy-9Z-octadecensäure (12,13-Ep-8-HOME) (Garscha und Oliw, 2009).

In Abb. 15B ist das auf  $m/z$  295 extrahierte Ionenchromatogramm dargestellt. Dieser  $m/z$ -Quotient entspricht der Summe aus dem Molekulargewicht von 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> zuzüglich eines Sauerstoffatoms und abzüglich eines Protons. Es sind zwei distinkte Signale mit einer Retentionszeit von 19,7 min und 21,3 min erkennbar. Die Tandem-MS-Spektren beider Produkte sind in Abb. 15E dargestellt. Die Fragmentationenmuster entsprechen denen, die für 8R-HODE (Signal bei 19,7 min, Abb. 15E) und 10-Hydroxy-8E,12Z-octadecadiensäure (10-HODE) (Signal bei 21,3 min, Abb. 15F) beschrieben sind (Garscha und Oliw, 2007).

Zudem konnte bei  $m/z$  293 ein sehr schwaches Signal detektiert werden (Daten nicht gezeigt), dessen Tandem-MS-Spektrum in Abb. 15G dargestellt ist und auf die Bildung von 8-Keto-9Z,12Z-octadecadiensäure (8-KODE) hindeutet (Oliw *et al.*, 1998).

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, dass bei der Reaktion von PpoA mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> neben 5,8-DiHODE und 8R-H(P)ODE außerdem geringe Mengen an 12,13-Ep-8-HOME, 10-HODE und 8-KODE entstehen, die spezifisch durch RP-HPLC/MS<sup>2</sup>-Messungen jedoch nicht durch GC/MS-Analysen nachgewiesen werden konnten.



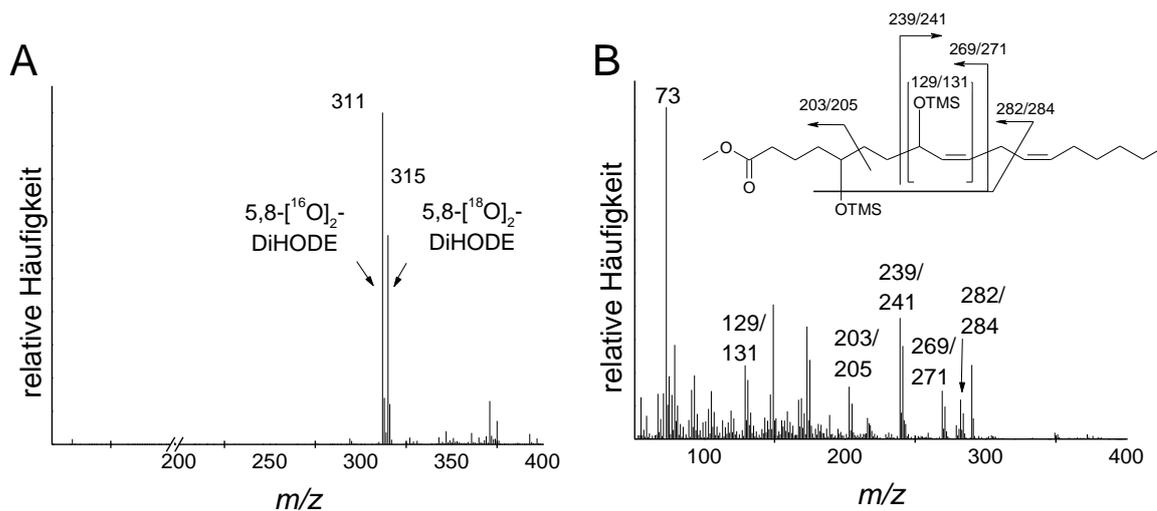
**Abb.15. RP-HPLC/MS<sup>2</sup>-Analyse der bei der Umsetzung von 18:2<sup>A9Z,12Z</sup> durch PpoA gebildeten Produkte.** 125 nM PpoA wurden für die Analyse mit 1 mM 18:2<sup>A9Z,12Z</sup> schüttelnd wie in 2.3.13.1 beschrieben inkubiert und mit Diethylether extrahiert. A. Auf  $m/z$  311 extrahiertes Ionenchromatogramm. B. Auf  $m/z$  295 extrahiertes Ionenchromatogramm. C-G Tandem-MS-Spektren und mögliche Fragmentationmuster von 5,8-DiHODE (C), 12,13-Ep-8-HOME (D), 8R-HODE (E), 10-HODE (F) und 8-KODE (G). DiHODE, Dihydroxyoctadecadiensäure; H(P)ODE, Hydro(per)xyoctadecadiensäure; KODE, Ketoctadecadiensäure; 12,13-Ep-8-HOME, 12,13-Epoxy-8-hydroxyoctadecensäure. Es handelt sich um repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Messungen.

## 3.2.6 Analyse des Reaktionsmechanismus

### 3.2.6.1 Analyse der Produktbildung unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre

Um zu analysieren, ob die beiden Sauerstoffatome der Hydroxy-Gruppen der 5,8-Dihydroxy-Derivate vom selben Sauerstoffmolekül oder von anderen Kosubstraten stammen, wurde 0,1 mM 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> mit PpoA in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) für 30 min unter einer mit  $^{18}\text{O}_2$  angereicherten Atmosphäre inkubiert (siehe 2.3.13.2). Anschließend wurden die Fettsäuren und die gebildeten Derivate mit Diethylether extrahiert und mittels RP-HPLC/MS und GC/MS analysiert. In Abb. 16A ist das resultierende ESI-MS-Spektrum der 5,8-DiHODE-Analyse (siehe 2.3.14.5) abgebildet. Es zeigt zwei distinkte Signale bei  $m/z$  311 und  $m/z$  315. Ein  $m/z$ -Quotient von 311 entspricht der molekularen Masse 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> zuzüglich zweier  $^{16}\text{O}$ -Atome und abzüglich eines Protons ( $M^- + 2 \text{ }^{16}\text{O}$ ). Analog entspricht ein  $m/z$ -Quotient von 315 der molekularen Masse von 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> zuzüglich zweier  $^{18}\text{O}$ -Atome und abzüglich eines Protons ( $M^- + 2 \text{ }^{18}\text{O}$ ). Da kein Signal mit  $m/z$  313 detektiert wurde, zeigen diese Daten, dass die beiden Hydroxy-Gruppen von 5,8-DiHODE entweder  $^{16}\text{O}$  oder  $^{18}\text{O}$  enthalten. Molekulare Spezies, die beide Sauerstoff-Isotope besitzen, konnten nicht nachgewiesen werden. Damit wird deutlich, dass die Sauerstoffatome der beiden Hydroxy-Gruppen vom gleichen Substratmolekül und damit vom molekularen Sauerstoff resultieren.

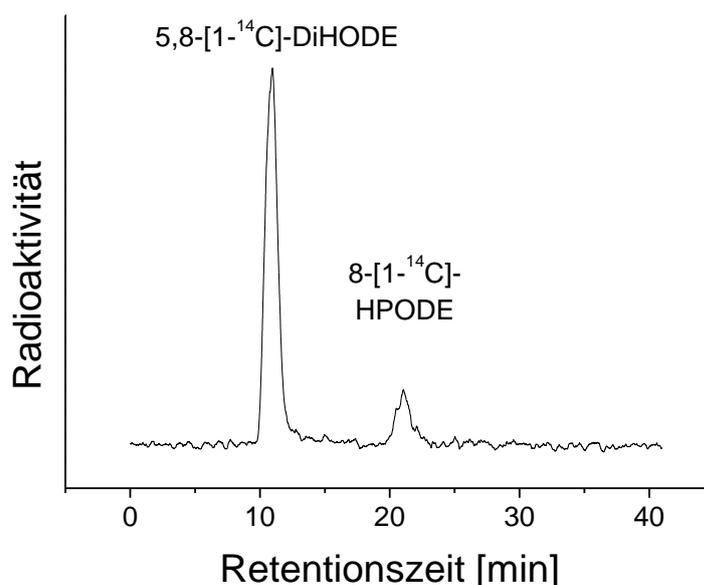
Zusätzlich wurde das unter  $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre gebildete 5,8-DiHODE mittels GC/MS analysiert. Hierzu wurde es zunächst über RP-HPLC (siehe 2.3.14.1) isoliert und anschließend, wie in 2.3.13.3 beschrieben, in das korrespondierende Methylsilylether-Methylester-Derivat überführt. In Abb. 15B ist das erhaltene EI-MS-Spektrum abgebildet, welches eine Mischung der 5,8-[ $^{16}\text{O}_2$ ]-DiHODE- und 5,8-[ $^{18}\text{O}_2$ ]-DiHODE-Methylsilylether-Methylester-Derivate darstellt. Anhand der  $m/z$ -Signale konnten die  $^{18}\text{O}$ -markierten Fragmente wie folgt identifiziert werden:  $m/z$  129/131 ( $\text{CH}(\text{OSiCH}_3)_3\text{-C}_2\text{H}_5$ ), 203/205 (Spaltung zwischen C-5 und C-6), 239/241 (Spaltung zwischen C-7 und C-8), 269/271 (Spaltung zwischen C-10 und C-11) und 282/284 (Spaltung zwischen C-12 und C-13). Die über GC/MS ermittelten Daten unterstreichen somit die mittels RP-HPLC/MS erhaltenen Ergebnisse.



**Abb.16. Massenspektrometrische Analyse der unter <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-Atmosphäre durch Inkubation von 18:2<sup>A9Z,12Z</sup> mit PpoA gebildeten Produkte.** A. ESI-MS-Spektrum von 5,8-DiHODE das nach der Inkubation von PpoA mit 0,1 mM 18:2<sup>A9Z,12Z</sup> unter <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-Atmosphäre erhalten wurde (siehe 2.3.13.2). B. EI-MS-Spektrum des Methylsilylether-Methylester-Derivats von 5,8-DiHODE, welches nach der Isolation über RP-HPLC (siehe 2.3.14.1) in das Methylsilylether-Methylester-Derivat überführt (siehe 2.3.13.3) und mittels GC/MS analysiert wurde (siehe 2.3.14.4). Es handelt sich um repräsentative Ergebnisse von zwei unabhängigen Messungen.

### 3.2.6.2 Analyse der 8-Hydroperoxid-Isomerase-Aktivität

Die unter 3.2.6.1 erhaltenen Ergebnisse legten die Vermutung nahe, dass 8*R*-HPODE als Zwischenprodukt der Reaktion von 18:2<sup>A9Z,12Z</sup> mit PpoA gebildet wird. Um dies zu überprüfen, wurde 8-[1-<sup>14</sup>C]-HPODE zunächst nach Umsetzung von [1-<sup>14</sup>C]-18:2<sup>A9Z,12Z</sup> durch PpoA mittels RP-HPLC isoliert (siehe 2.3.14.1) und anschließend mit 125 nM PpoA für 30 min inkubiert (siehe 2.3.13.1). Die Reaktion wurde durch Zugabe von Diethylether gestoppt und die Produkte anschließend extrahiert. Die gebildeten Produkte wurden mittels RP-HPLC mit einem Radiodetektor analysiert (2.3.14.2). In Abb. 17 ist ein repräsentatives Chromatogramm dieser Analyse dargestellt, das zeigte, dass [1-<sup>14</sup>C]-8*R*-HPODE durch PpoA in 5,8-[1-<sup>14</sup>C]-DiHODE umgewandelt werden kann.



**Abb.17. Radio-HPLC-Analyse der Produkte nach Inkubation von [1-<sup>14</sup>C]-8R-HPODE mit PpoA.** [1-<sup>14</sup>C]-8R-HPODE wurde nach Umsetzung von [1-<sup>14</sup>C]-18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> durch PpoA mittels RP-HPLC isoliert (siehe 2.3.14.1) und mit PpoA für 30 min in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) inkubiert (siehe 2.3.13.1). Nach der Extraktion mit Diethylether erfolgte die Analyse durch RP-HPLC mit Radiodetektor (siehe 2.3.14.2). Es handelt sich um ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Messungen.

Dieses Experiment sowie die Analyse der Produktbildung unter <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-Atmosphäre zeigen, dass bei der Umwandlung von 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> zu 5,8-DiHODE durch PpoA, 8R-HPODE als Zwischenprodukt gebildet wird. Die starken Schwankungen der Menge an gebildetem 8R-HPODE in den verschiedenen Experimenten (siehe 3.2.5.1), könnten damit auf eine empfindliche 8-Hydroperoxid-Isomerase-Aktivität hindeuten, die durch Störungen der Proteinfaltung beeinflusst sein könnte.

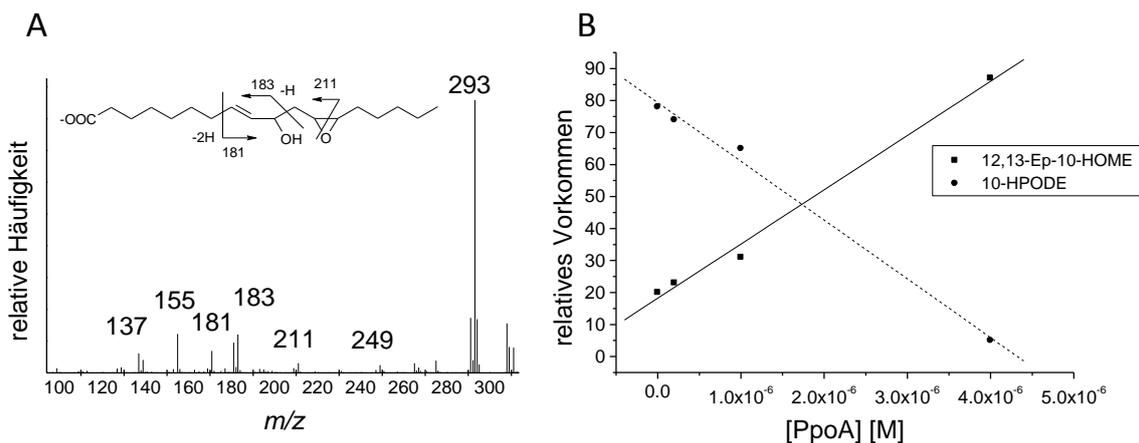
### 3.2.6.3 Analysen einer mutmaßlichen Epoxyalkohol-Synthase-Aktivität (EAS)

Wie in 3.2.5.3 dargestellt, wurden bei Inkubationen von PpoA mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> und anschließender Analyse mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> sehr geringe Mengen des Epoxyalkohols 12,13-Ep-8-HOME nachgewiesen. Die gleiche Beobachtung wurde auch für Inkubationen von PpoA mit 8R-HPODE gemacht, bei denen 5,8-DiHODE aber stets das Hauptprodukt der Reaktion war. Die geringen Mengen des gebildeten Epoxyalkohols erschwerten eine Analyse, die klären könnte, ob dieses Produkt tatsächlich enzymatischen Ursprungs ist.

Um dennoch Aussagen über eine mutmaßliche EAS-Aktivität anstellen zu können, wurde für die folgende Analyse 10-HPODE verwendet, dessen korrespondierendes Hydroxid 10-HODE auch in geringen Mengen während der Reaktion von PpoA mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> gebildet wird (vgl. Abb. 15), da

dieses Substrat vermutlich nicht von PpoA zu einem Dihydroxy-Derivat umgewandelt werden kann. Es wurde außerdem bereits berichtet, dass 10-HPODE von der *A. fumigatus* 10R-Dioxygenase zu dem Epoxyalkohol 12,13-Epoxy-10-hydroxyoctadecensäure (12,13-Ep-10-HOME) umgewandelt werden kann (Garscha und Oliw, 2009).

10-HPODE konnte durch die Reaktion von 18:2<sup>Δ<sup>9Z</sup>,12Z</sup> mit PpoC (siehe 3.2.13.1) hergestellt und mittels RP-HPLC isoliert werden (siehe 3.2.14.1). Für die Analyse wurden 500 μM 10-HPODE mit PpoA für 40 min bei Raumtemperatur in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) inkubiert und anschließend wie in 2.3.13.1 beschrieben mit Diethylether extrahiert. Die Produkt-Analyse erfolgte mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> (siehe 2.3.14.5). Es zeigte sich, dass 10-HPODE durch PpoA in 12,13-Ep-10-HOME, überführt wird. Ein Tandem-MS-Spektrum ist in Abb. 18A dargestellt. Um eine sichere Aussage über eine enzymatische oder nicht enzymatisch Produktbildung machen zu können, wurden in einem Folgeexperiment 500 μM 10-HPODE mit verschiedenen PpoA-Konzentrationen für 40 min bei Raumtemperatur in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) inkubiert und anschließend mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.13.1). Die Analyse erfolgte mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> (siehe 2.3.14.5). Die relativen Mengen des während der Reaktion gebildeten 12,13-Ep-10-HOME und verbrauchten 10-HPODE wurden durch die Integration der korrespondierenden Signale bei  $m/z$  311 mit Hilfe der Xcalibur-Software bestimmt. In Abb. 18B sind die relativen Mengen von 10-HPODE und 12,13-Ep-10-HOME in Abhängigkeit von der PpoA-Konzentration dargestellt. Wie zu erkennen ist, korreliert die Menge an gebildeten Produkt und verbrauchtem Substrat mit der verwendeten Enzym-Konzentration, so dass eine enzymatische Umwandlung angenommen werden kann. Aber dennoch sollte an dieser Stelle betont werden, dass die EAS-Aktivität von PpoA sehr gering ist und lediglich eine Nebenreaktion darstellt.



**Abb.18. RP-HPLC/MS<sup>2</sup>-Analyse der EAS-Nebenaktivität von PpoA.** A. Tandem-MS-Spektrum des durch PpoA von 10-HPODE gebildeten 12,13-Ep-10-HOMEs. Für die Reaktion wurden 1  $\mu$ M PpoA mit 500  $\mu$ M 10-HPODE bei Raumtemperatur für 40 min inkubiert und mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.13.1). Die Analyse erfolgte mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> (siehe 2.3.14.5). B. Analyse der relativen Mengen von gebildeten 12,13-Ep-10-HOME und des während der Reaktion verbrauchten 10-HPODE in Abhängigkeit von der PpoA-Konzentration. Die Reaktion erfolgte bei PpoA-Konzentrationen zwischen 0,2 und 5  $\mu$ M. Die relativen Mengen an 12,13-Ep-10-HOME und 10-HPODE wurden über Integration der korrespondierenden Signale bei  $m/z$  311 mit Hilfe der Xcalibur-Software bestimmt.

### 3.2.6.4 Abfangen kohlenstoffzentrierter Fettsäure-Radikale mit Hilfe von stabilen Nitroxyl-Radikalen

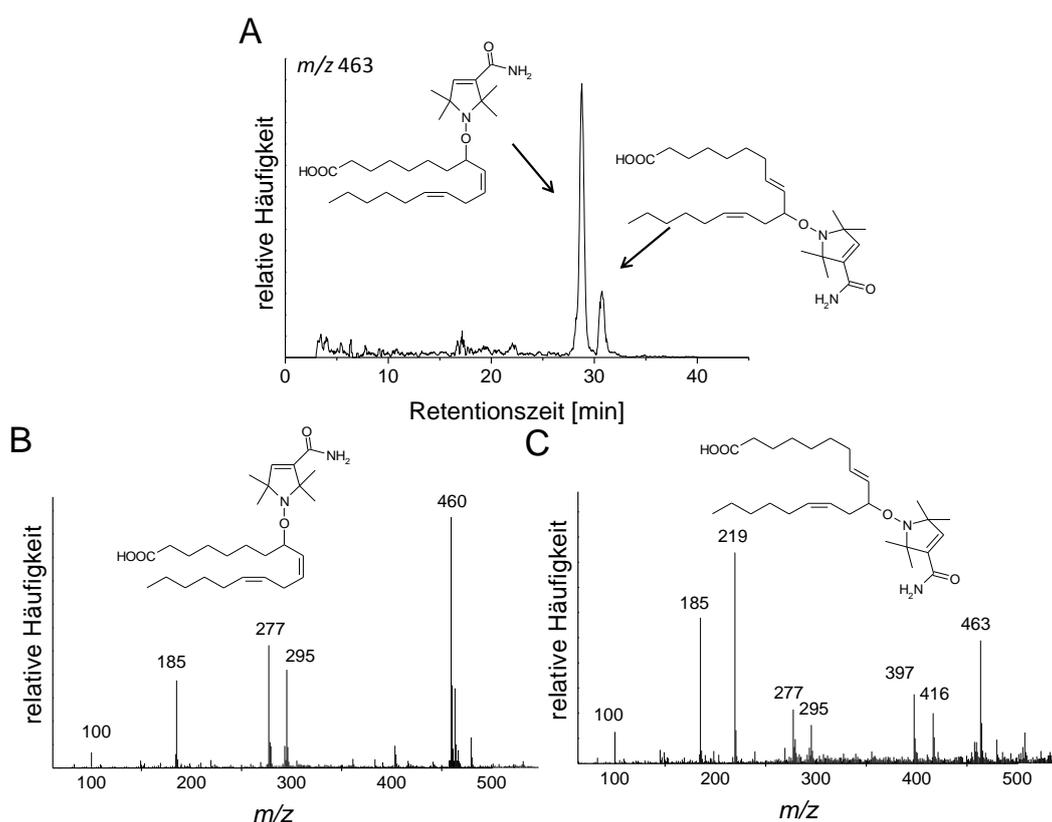
Um die Bildung kohlenstoffzentrierter Radikale am Fettsäurerückgrat zu analysieren, wurde die Methode von Koshiishi und Mitarbeitern (Koshiishi *et al.*, 2005, Koshiishi *et al.*, 2006, Takajo *et al.*, 2007) verwendet. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Fettsäure-Radikale, die während der Reaktion der LOX mit 18:2 <sup>$\Delta$ 9Z,12Z</sup> gebildet werden, mit Hilfe von stabilen Nitroxyl-Radikalen abgefangen werden können. Es ist bekannt, dass die Produkte des LOX/18:2 <sup>$\Delta$ 9Z,12Z</sup>-Systems aus zwei verschiedenen Regioisomeren bestehen, dem 9-Hydro(pero)xy- und dem 13-Hydro(pero)xy-Derivat. Wurde der Radikalfänger 3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-N-oxyl (Cm $\Delta$ P), der kein chirales Zentrum besitzt, für die Reaktion verwendet, so beobachteten Koshiishi und Mitarbeiter mit HPLC/MS<sup>2</sup> die Bildung zweier distinkter Signale mit einem  $m/z$ -Quotienten von 463. Es wurde postuliert, dass diese beiden Signale auf die Bildung von 9- bzw. 13-Cm $\Delta$ P-Fettsäure-Addukte hindeuten. Da PpoA unter anderem auch die Regioisomere 8R-H(P)ODE und 10-H(P)ODE bilden kann, wurde für das vorliegende Experiment ebenfalls der Radikalfänger Cm $\Delta$ P verwendet. Dieser konkurriert während der Reaktion mit dem Diradikal-Sauerstoff um die intermediär gebildeten Fettsäure-Radikale. Aus diesem Grund war es wichtig, dass die Experimente mit Puffersystemen durchgeführt wurden, in denen nur wenig Sauerstoff gelöst war.

Das vorliegende Experiment wurde wie 2.3.14.6 beschrieben durchgeführt. PpoA wurde zusammen mit 18:2 <sup>$\Delta$ 9Z,12Z</sup> und Cm $\Delta$ P in entgastem HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) für 30 min inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde mit Argon überschichtet, um die Diffusion von Atmosphären-Sauerstoff in

das System zu verhindern bzw. zu verlangsamen. Die Fettsäure und die gebildeten Derivate wurden mit Diethylether extrahiert und über RP-HPLC/MS analysiert (siehe 2.3.14.5).

In Abb. 19 ist ein repräsentatives Chromatogramm der RP-HPLC/MS-Analyse dargestellt. Abb. 14A zeigt ein auf  $m/z$  463 extrahiertes Ionenchromatogramm. Es können zwei distinkte Signale bei 28,8 min und 30,8 min beobachtet werden. Die korrespondierenden Esi-MS-Spektren sind in Abb. 14B und 14C dargestellt. Beide Spektren zeigen ein deutliches Signal mit  $m/z$  185. Dieses Fragmentation entsteht durch die heterolytische Spaltung der C-O-N Bindung und die Bildung eines Hydroxylamins ( $m/z$  185) und wurde ebenfalls von Koshiishi und Mitarbeitern für das LOX/18:2 <sup>$\Delta$ 9Z,12Z</sup>-System beschrieben (Koshiishi *et al.*, 2005). Eine Analyse der beiden Signale mit einem Dioden-Array-Detektor zeigte, dass keines von beiden ein Absorptionsmaximum bei 234 nm aufwies. Damit kann angenommen werden, dass keines der gebildeten Addukte ein konjugiertes Doppelbindungssystem besaß.

In Analogie zu den von Koshiishi und Mitarbeitern beschriebenen Ergebnissen kann somit angenommen werden, dass die beiden Signale bei  $m/z$  463 auf die Bildung von C-8- und C-10-Radikal-Addukten hindeuten.



**Abb.19. RP-HPLC/MS-Analyse der 18:2 <sup>$\Delta$ 9Z,12Z</sup>-Cm $\Delta$ P-Addukte.** PpoA wurde in entgastem HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) für 30 min mit 18:2 <sup>$\Delta$ 9Z,12Z</sup> und Cm $\Delta$ P inkubiert und anschließend mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.14.6). Die RP-HPLC/MS<sup>2</sup>-Analyse erfolgte wie in 2.3.14.5 beschrieben. A. Auf  $m/z$  463 extrahiertes Ionenchromatogramm. B und C Esi-MS-Spektren der Signale bei einer Retentionszeiten von 28,8 min (B) bzw. 30,8 min (C). Es handelt sich um ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Messungen.

### 3.2.7 Kinetische Analysen

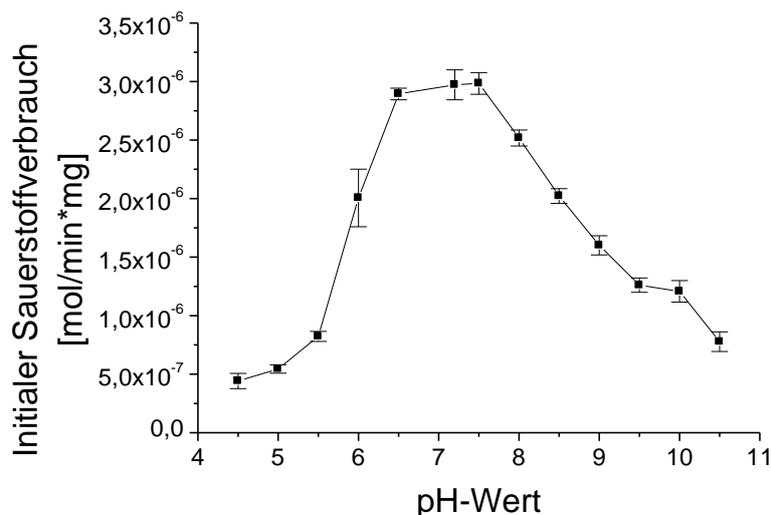
Da PpoA für die Umwandlung ungesättigter Fettsäuren zu den 8-Hydro(pero)xy- bzw. 5,8-Dihydroxy-Fettsäurederivaten molekularen Sauerstoff benötigt, konnte der Verbrauch dieses Kosubstrates mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode quantitativ verfolgt werden. Es sollte jedoch darauf hingewiesen werden, dass mit dieser Technik lediglich der erste Reaktionsschritt des zweistufigen Reaktionsverlaufs kinetisch analysiert werden kann, nämlich der Einbau von Sauerstoff an das Fettsäurerückgrat bzw. die Bildung des 8-Hydro(pero)xy-Fettsäurederivats. Über den folgenden Reaktionsschritt, in dem die Isomerisierung des 8-Hydroperoxy-Fettsäurederivats zum 5,8-Dihydroxy-Fettsäurederivat stattfindet, gibt die Analyse jedoch keine Auskunft, da Sauerstoff bei dieser Reaktion weder verbraucht noch gebildet wird.

Die folgenden Analysen an der Sauerstoffelektrode wurden mit den Natriumsalzen verschiedener Fettsäuren durchgeführt. Diese sind aufgrund ihrer zusätzlichen negativen Ladung in wässrigen Puffersystemen besser löslich, so dass die Bildung von Mizellen bei den verwendeten Konzentrationen verhindert werden kann. Die Herstellung der verwendeten Natriumsalze ist in 2.3.15.1 beschrieben.

Durch den Abschluss der Reaktionskammer von der Umgebung wurde gewährleistet, dass nach Reaktionsbeginn kein Atmosphären-Sauerstoff in das System diffundierte. Somit konnte die Sauerstoffmenge in einem definierten Reaktionssystem unter der Annahme berechnet werden, dass bei 24 °C und 1013,25 hPa 8,25 mg Sauerstoff pro Liter gelöst sind. Dies entspricht einer Menge von 257,8 µmol/L.

#### 3.2.7.1 Analyse des pH-Optimums

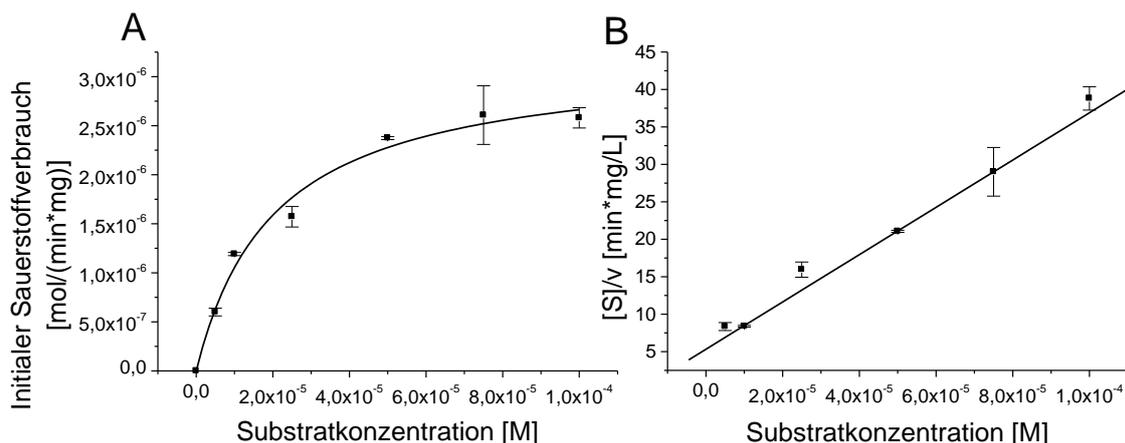
Die Bestimmung des pH-Optimums erfolgte wie in 2.3.15.2 beschrieben mit 125 nM PpoA und 100 µM des Natriumsalzes von 18:2<sup>A9Z,12Z</sup>. Die initiale Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs wurde bei verschiedenen pH-Werten gemessen und ist in Abb. 20 in Abhängigkeit des pH-Wertes graphisch dargestellt. Es zeigte sich, dass PpoA ein relativ breites pH-Optimum für die enzymatische Aktivität von pH 6,5 bis pH 7,5 besitzt.



**Abb.20. Darstellung des pH-Optimums der PpoA-Aktivität mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup>.** Dargestellt ist die initiale Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs für die Reaktion von 125 nM PpoA mit 100 μM 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> bei 24 °C in Abhängigkeit der verschiedenen pH-Werte (siehe 2.3.15.2). Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus drei Messungen.

### 3.2.7.1 Analyse kinetischer Parameter

Kinetische Parameter wurden durch die Messung der initialen Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs bei verschiedenen Substratkonzentrationen bestimmt (siehe 2.3.15.2). Die Reaktionen wurden in Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,2) bei einer Temperatur von 24 °C durchgeführt und durch die Zugabe von 125 nM PpoA gestartet. Als Substrate wurden die Natriumsalze von 16:1<sup>Δ9Z</sup>, 18:1<sup>Δ9Z</sup>, 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> und 18:3<sup>Δ9Z,12Z,15Z</sup> verwendet. Exemplarisch ist in Abb. 21A das Michaelis-Menten-Diagramm für die Reaktion von PpoA mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> dargestellt. Die Werte für  $K_M$  und  $V_{max}$  wurden über die Hanes-Woolf-Gleichung ermittelt. Hierzu wurde der Quotient aus Substratkonzentration und initialer Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs in Abhängigkeit der Substratkonzentration aufgetragen. Exemplarisch ist in Abb. 21B das Hanes-Woolf-Diagramm für die Reaktion von PpoA mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> gezeigt. Weiterhin sind in Tab. 5 die verschiedenen  $K_M$ ,  $V_{max}$ ,  $k_{cat}$  und  $k_{cat}/K_M$ -Werte aufgelistet. Anhand der  $k_{cat}/K_M$ -Werte lässt sich erkennen, dass die Substratspezifität für PpoA mit zunehmender Anzahl an Doppelbindungen am Fettsäurerückgrat zumindest für den ersten Reaktionsschritt sinkt. Demnach erscheint 18:1<sup>Δ9Z</sup> das präferierte Substrat zu sein.



**Abb.21. Kinetische Analyse der Reaktion von PpoA mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode.** A. Michaelis-Menten-Diagramm, in dem die Geschwindigkeit des initialen Sauerstoffverbrauchs in Abhängigkeit der verschiedenen 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup>-Konzentrationen aufgetragen ist. Die Reaktionen erfolgten in Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,2) mit 125 nM PpoA bei 24 °C (siehe 2.3.15.2). B. Hanes-Woolf-Auftragung zur Ermittlung der  $K_M$ - und  $V_{max}$ -Werte. Die Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus drei Messungen.

**Tab.5: Kinetische Parameter für die Reaktion von PpoA mit verschiedenen ungesättigten Fettsäuren.** Die kinetische Analyse wurde mit einer Sauerstoffelektrode durchgeführt; hierzu wurde der initiale Sauerstoffverbrauch für die Reaktion mit verschiedenen Substraten bei verschiedenen Konzentrationen gemessen (siehe 2.3.15.2). Als Substrate wurden die Natriumsalze der entsprechenden Fettsäure verwendet. Die Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus je drei Messungen.

Substrat	$V_{max}$ [ $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ ]	$K_M$ [ $\mu\text{M}$ ]	$k_{cat}$ [1/min]	$k_{cat}/K_M$ [ $\text{min}^{-1} \text{M}^{-1}$ ] $\times 10^6$
16:1 <sup>Δ9Z</sup>	1,76±0,102	5,00±0,85	211±12,3	42,2±7,6
18:1 <sup>Δ9Z</sup>	2,48±0,072	6,71±0,74	297±8,6	44,3±5,05
18:2 <sup>Δ9Z,12Z</sup>	3,16±0,18	18,30±2,6	379±21,6	20,3±3,03
18:3 <sup>Δ9Z,12Z,15Z</sup>	2,97±0,27	22,6±4,3	356±32	15,8±3,3

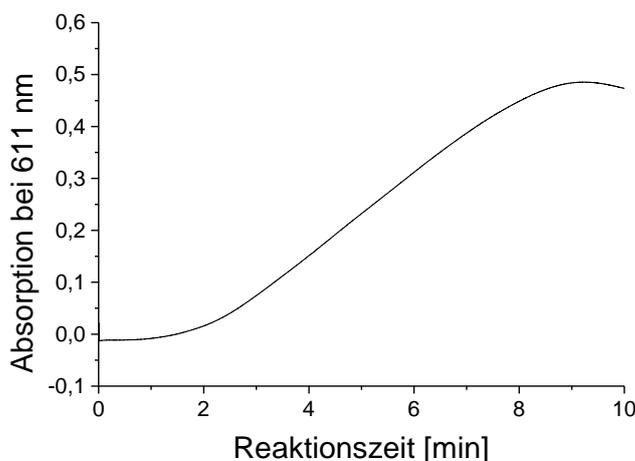
Bei den kinetischen Analysen an der Sauerstoffelektrode konnte zudem beobachtet werden, dass der Sauerstoffverbrauch bei der Reaktion von PpoA mit dem Fettsäuresubstrat nach dem Start mit einer Verzögerung von wenigen Sekunden einsetzte (Daten nicht gezeigt). Ein ähnliches Phänomen wurde bereits für die PGHS und 7,8-LDS beschrieben (Su *et al.*, 1998, Smith *et al.*, 2000). Im Fall von PpoA dauerte diese Verzögerung 3 sec bis maximal 5 sec, wenn die Reaktion mit Hydroperoxid-freier Fettsäure durchgeführt wurde. Die Verzögerung wurde deutlich verkürzt bzw. war nicht mehr zu beobachten, wenn weniger reine Fettsäure verwendet wurde. Diese Beobachtung zeigt, dass PpoA in der nativen Form inaktiv ist und durch Hydroperoxide zunächst aktiviert werden muss.

Außerdem konnte beobachtet werden, dass die Reaktion einen Endpunkt erreicht hatte, bevor eines der beiden Substrate Sauerstoff und Fettsäure aufgebraucht waren. Dieses Phänomen ist ebenfalls für die 7,8-LDS und PGHS beschrieben und wird hier als *suicide inactivation* bezeichnet (Smith *et al.*, 2000, Su *et al.*, 1998).

### 3.2.8 Analyse der Peroxidase-Aktivität

Bei der Reaktion von PpoA mit  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  wurden geringe Mengen des 8-Hydroxy-Derivats 8R-HODE als Nebenprodukt nachgewiesen. Um zu untersuchen, ob diese Reduktion des 8-Hydroperoxy-Fettsäurederivats zum 8-Hydroxy-Fettsäurederivat durch PpoA enzymatisch katalysiert werden kann, wurde das kolorimetrische Testsystem von Kulmacz verwendet (siehe 2.3.13.4). Mit dieser Methode konnte durch Verwendung des Kosubstrates *N,N,N',N'*-Tetramethyl-p-Phenylendiamin (TMPD) die Peroxidase-Aktivität der PGHS-1 nachgewiesen (Kulmacz, 1987). Wird die Reduktion eines Hydroperoxids zu einem Hydroxid durch eine Peroxidase in Gegenwart von TMPD durchgeführt, so fungiert dieses Kosubstrat als Elektronen-Donor für die Reduktion und wird dabei selbst oxidiert. Das entstehende Produkt weist ein Absorptionsmaximum bei 611 nm auf. Somit kann die Bildung des oxidierten TMPDs so spektroskopisch in Abhängigkeit von der Zeit verfolgt werden.

Die Reaktion wurde mit 125 nM PpoA, 100  $\mu$ M TMPD und 100  $\mu$ M  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) bei Raumtemperatur, wie in 2.3.13.4 beschrieben, durchgeführt. In Abb. 22 ist die charakteristische Zunahme der Absorption bei 611 nm in Abhängigkeit von der Zeit graphisch dargestellt und repräsentiert eine typische Progress-Kurve.



**Abb.22. Kolorimetrischer Peroxidase-Test.** 125 nM PpoA wurden mit 100  $\mu$ M  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  und 100  $\mu$ M TMPD bei Raumtemperatur inkubiert und die Zunahme der Absorption bei 611 nm (oxidiertes TMPD) wurde über 10 min aufgenommen (siehe 2.3.13.4). Es handelt sich um ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei Messungen.

Wurden anschließend die Reaktionsprodukte mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.13.1) und mittels RP-HPLC analysiert (siehe 2.3.14.1), so zeigte sich, dass das Hauptprodukt der Reaktion 8*R*-HODE war, während die Menge an gebildeten 5,8-DiHODE deutlich reduziert war (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die Peroxidase-Reaktion in der Anwesenheit eines adäquaten Elektronendonors wie z.B. TMPD bevorzugt abläuft, während die Isomerase-Aktivität herabgesetzt ist.

### 3.2.9 Mutagenesestudien an PpoA

Wie in Abb. 9 dargestellt und in 3.1 beschrieben, zeigen Aminosäuresequenzvergleiche der N-terminalen Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne und der C-terminalen Cytochrom-P450-Domäne von PpoA mit anderen Fettsäure-Häm-Dioxygenasen/Peroxidasen beziehungsweise anderen Cytochrom-P450-Enzymen, dass in beiden Domänen verschiedene Aminosäurereste konserviert sind. Um zu untersuchen, welche Reste für die Dioxygenase- bzw. die Isomerase-Aktivität von PpoA essentiell sind, wurden gerichtete Punktmutagenesestudien durchgeführt. Die Plasmide mit den ausgetauschten Nukleotiden wurden wie in 2.3.4.2 beschrieben generiert. Die Expression erfolgt wie in 2.3.8 für das native PpoA beschrieben.

#### 3.2.9.1 Mutagenese katalytisch essentieller Aminosäuren in der Peroxidase- und Cytochrom-P450-Domäne

Aminosäuresequenzvergleiche der Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne von PpoA mit den Sequenzen von PGHS-1, PGHS-2 und 7,8-LDS (siehe Abb. 9) zeigten verschiedene konservierte Aminosäurereste. Einer dieser Reste ist Tyr-374 in der Aminosäuresequenz von PpoA. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das entsprechende Tyrosin in *O. aries* PGHS-1 (Tyr-385), *O. aries* PGHS-2 (Tyr-370) und *G. graminis* 7,8-LDS (Tyr-374) essentiell für die katalytische Aktivität der Enzyme ist (Thuresson *et al.*, 2001, Garscha und Oliw, 2008a). Auf der Grundlage verschiedener ESR-Analysen mit PGHS und 7,8-LDS wurde postuliert, dass während der enzymatischen Reaktion an diesem Tyrosin ein Radikal generiert wird, welches für die Abspaltung eines spezifischen Wasserstoffs am Fettsäurerückgrat verantwortlich ist (Tsai *et al.*, 1994). Konsequenterweise führte der gezielte Austausch dieses Tyrosins in PGHS-1, PGHS-2 und 7,8-LDS gegen Phenylalanin zu einem Verlust der Dioxygenase-Aktivität dieser Enzyme (Thuresson *et al.*, 2001, Garscha und Oliw, 2008a).

In der Cytochrom-P450-Domäne konnten über Aminosäuresequenzvergleiche ebenfalls verschiedene konservierte Aminosäurereste identifiziert werden. His-1004 ist in vielen mutmaßlichen Ppo-artigen Enzymen konserviert und ist außerdem Teil des Häm-Bindungssignatur-Motivs (siehe Abb. 9). Ebenfalls Teil des Häm-Bindungssignatur-Motivs ist Cys-1006. Dieser Aminosäurerest fungiert in

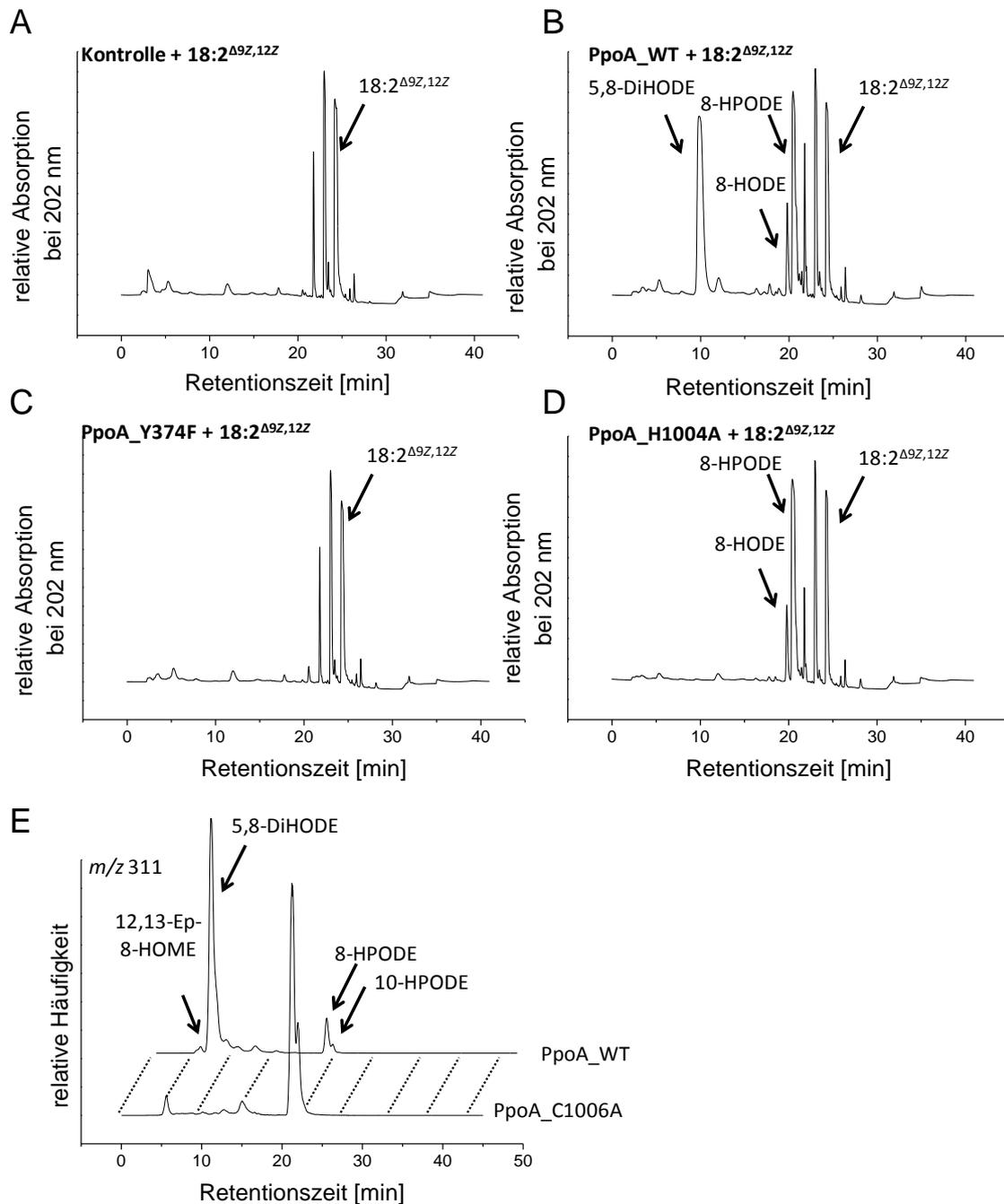
allen Cytochrom-P450-Enzymen als fünfter Häm-Eisen-Ligand und die Mutation dieses Restes führte zu einer Inaktivierung des Enzyms, wie es z.B. für P450cam gezeigt worden ist (Yoshioka *et al.*, 2001).

Um zu untersuchen, welche Bedeutung diese Aminosäurereste für die enzymatische Aktivität von PpoA haben, wurde Tyr-374 gegen Phe und His-1004 wie auch Cys-1006 gegen Ala ausgetauscht (siehe 2.3.4.2). Diese PpoA-Varianten werden im Folgenden als PpoA\_Y374F, PpoA\_H1004A bzw. PpoA\_C1006A bezeichnet; analog wird natives PpoA als PpoA\_WT (engl. *wild type*) bezeichnet.

### 3.2.9.1.1 Analyse der Dioxygenase-Aktivität

PpoA\_Y374F und PpoA\_H1004A wurden wie in 2.3.8 beschrieben exprimiert und über das in 3.2.2. dargestellte Protokoll gereinigt. Für die Analyse der enzymatischen Aktivität wurden zunächst 125 nM beider PpoA-Varianten mit 0,1 mM 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup>, wie in 2.3.13.1 beschrieben, schüttelnd inkubiert und anschließend mit Diethylether extrahiert. Parallel wurde als Kontrolle das gleiche Experiment unter identischen Bedingungen mit PpoA\_WT und mit hitzeinaktiviertem PpoA\_WT (5 min bei 96 °C) durchgeführt. Die Analyse der gebildeten Produkte erfolgte über RP-HPLC und Detektion bei A<sub>202 nm</sub> (siehe 2.3.14.1). Wie in Abb. 23 dargestellt, wurde bei der Inkubation von PpoA\_Y374F mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> weder die Bildung von 8R-H(P)ODE noch von 5,8-DiHODE beobachtet (siehe Abb. 23C). Im Gegensatz hierzu konnte bei der RP-HPLC-Analyse der durch PpoA\_H1004A und 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> gebildeten Produkte 8R-HPODE aber kein 5,8-DiHODE detektiert werden (siehe Abb. 23D).

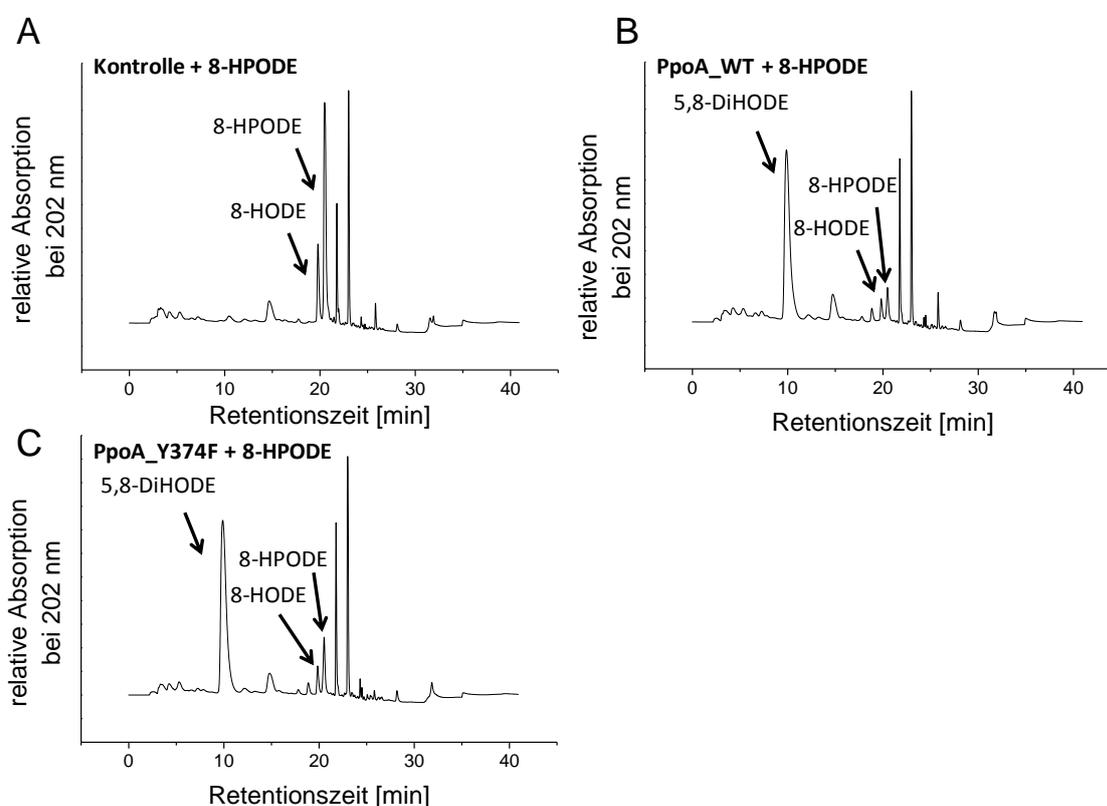
Für die Analyse der von 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> und PpoA\_C1006A gebildeten Produkte wurde Zellextrakt PpoA\_C1006A-exprimierender Zellen verwendet, der mit 0,1 mM 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> inkubiert worden war (siehe 2.3.13.1). Parallel wurde als Kontrolle Zellextrakt PpoA\_WT-exprimierender Zellen mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> inkubiert. Nach der Extraktion mit Diethylether erfolgte die Analyse über RP-HPLC/MS<sup>2</sup> (siehe 2.3.14.5) wie in Abb. 23E dargestellt. Für PpoA\_C1006A wurde die gleiche katalytische Aktivität wie für PpoA\_H1004A beobachtet. So wurde zwar 8R-HPODE jedoch kein 5,8-DiHODE gebildet.



**Abb.23. Analyse der von PpoA\_WT, PpoA\_Y374F, PpoA\_H1004A bzw. PpoA\_C1006A mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> gebildeten Produkte.** A-D. RP-HPLC-Analyse nach der Inkubation von 0,1 mM 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> mit 125 nM hitzeinaktivierter PpoA\_WT (A), PpoA\_WT (B), PpoA\_Y374F (C) und PpoA\_H1004A (D) in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) für 60 min bei Raumtemperatur und anschließender Extraktion mit Diethylether (siehe 2.3.13.1 bzw. 2.3.14.1). E. RP-HPLC/MS<sup>2</sup>-Analyse nach der Inkubation von Zellextrakt PpoA\_C1006A- und PpoA\_WT-exprimierender Zellen mit 0,1 mM 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> für 60 min bei Raumtemperatur und anschließender Extraktion mit Diethylether (siehe 2.3.13.1. bzw. 2.3.14.5). Es handelt sich um ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Messungen. H(P)ODE, Hydro(pero)xyoctadecadiensäure; DiHODE, Dihydroxyoctadecadiensäure.

### 3.2.9.1.2 Analysen der 8-Hydroperoxid-Isomerase-Aktivität

Da PpoA\_Y374F keine enzymatische Aktivität mit 18:2<sup>A9Z,12Z</sup> aufwies, sollte in dem folgenden Experiment untersucht werden, ob durch den Austausch von Tyr-374 durch Phe beide Reaktionsschritte, d. h. sowohl die Dioxygenase- als auch die Isomerase-Aktivität, oder nur der erste Reaktionsschritt beeinflusst wird. Hierzu wurden 125 nM PpoA mit 8*R*-HPODE für 30 min in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) inkubiert und anschließend mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.13.1). Die Analyse der gebildeten Produkte erfolgte über RP-HPLC (siehe 2.3.14.1). Parallel wurde das gleiche Experiment unter identischen Bedingungen mit 125 nM hitzeinaktivierten PpoA\_WT durchgeführt. In Abb. 24 ist das Ergebnis der RP-HPLC-Analyse dargestellt. Bei der Inkubation von PpoA\_WT und von PpoA\_Y374F mit 8*R*-HPODE wurde 5,8-DiHODE gebildet (siehe Abb. 24B bzw. 24C).



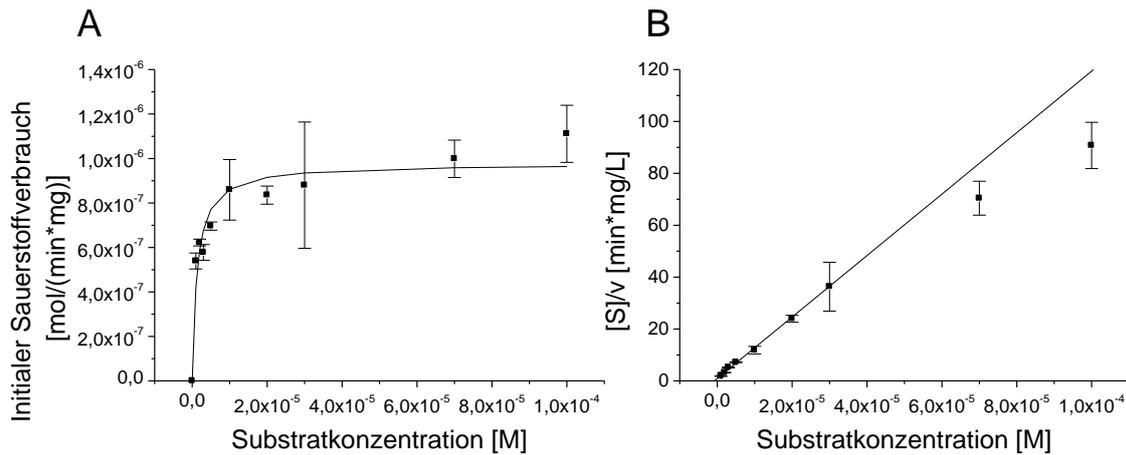
**Abb.24. RP-HPLC Analyse der von 8*R*-HPODE und PpoA\_WT bzw. PpoA\_Y374F gebildeten Produkte.** Für die Analyse wurden 125 nM von hitzeinaktivierten PpoA (A), PpoA\_WT (B) und PpoA\_Y374F (C) mit über RP-HPLC isoliertem 8*R*-HPODE für 30 min in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) bei Raumtemperatur inkubiert und mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.13.1). Es handelt sich um ein repräsentatives Ergebnis von mindestens drei unabhängigen Messungen. H(P)ODE, Hydro(pero)xyoctadecadiensäure; DiHODE, Dihydroxyoctadecadiensäure.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass der erste Reaktionsschritt, der zur Bildung des 8-Hydroperoxy-Fettsäurederivats führt, in der N-terminalen Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne erfolgt. Der zweite Reaktionsschritt, bei dem das intermediär gebildete 8-Hydroperoxy-Fettsäurederivat zu dem Endprodukt, dem 5,8-Dihydroxy-Fettsäurederivat isomerisiert wird, erscheint in der C-terminalen Cytochrom-P450-Domäne zu erfolgen. Dieser Domäne wurde deshalb eine 8-Hydroperoxid-Isomerase-P450-Aktivität zugeordnet.

### 3.2.9.1.3 Kinetische Analysen der Dioxygenase-Aktivität von PpoA\_H1004A

Wie in 3.2.7 beschrieben kann der Sauerstoffverbrauch während des ersten Reaktionsschritts der Reaktion von PpoA mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> zu 8R-HPODE (Dioxygenase-Reaktion) mit Hilfe der Sauerstoffelektrode kinetisch untersucht werden. Da 8R-HPODE im folgenden Reaktionsschritt allerdings zu dem Endprodukt 5,8-DiHODE isomerisiert und somit dem Reaktionsgleichgewicht der Dioxygenase-Reaktion entzogen wird, ist eine kinetische Beeinflussung des ersten Reaktionsschrittes durch den zweiten Reaktionsschritt denkbar. Im Falle von PpoA\_H1004A ist die 8-Hydroperoxid-Isomerase-Aktivität inhibiert und 8R-HPODE kann nicht zum Endprodukt 5,8-DiHODE isomerisiert werden (siehe 3.2.9.1). Mit Hilfe dieses Systems kann somit die Dioxygenase-Aktivität von der Isomerase-Aktivität kinetisch isoliert untersucht werden.

Die kinetische Analyse wurde wie in 2.3.15.2 beschrieben durchgeführt. Hierzu wurden 125 nM PpoA\_H1004A mit verschiedenen Konzentrationen von 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> inkubiert und die Geschwindigkeit des initialen Sauerstoffverbrauchs bestimmt. Die Reaktionen erfolgten in Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,4) bei einer Temperatur von 24 °C und wurden durch Enzymzugabe gestartet. In Abb. 25 ist das erhaltene Michaelis-Menten-Diagramm sowie das korrespondierende Hanes-Woolf-Diagramm dargestellt. Die kinetischen Parameter wurden anhand der Hanes-Woolf Auftragung ermittelt. Es ergaben sich die folgenden Werte:  $K_M = 4,90 \pm 0,62 \mu\text{M}$ ,  $V_{max} = 1,16 \pm 0,05 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ ,  $k_{cat} = 139 \text{ min}^{-1}$  und  $k_{cat}/K_M = (28,3 \pm 3,81) \times 10^6 \text{ min}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . Wie zu erkennen ist, sind die Werte von  $K_M$ ,  $V_{max}$  und  $k_{cat}$  für die Reaktion von PpoA\_H1004A im Vergleich zu der Reaktion von PpoA\_WT (siehe Tab. 5) um einen Faktor von 3-4 reduziert. Damit ergeben sich für PpoA\_H1004A und PpoA\_WT ähnliche  $k_{cat}/K_M$ -Werte. Diese Analyse deutet darauf hin, dass es sich bei der Dioxygenase-Reaktion und damit dem ersten Reaktionsschritt um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt handelt. Dies könnte somit auch erklären, warum in einigen Experimenten, in denen 5,8-DiHODE das Hauptprodukt war, nur Spuren des Reaktionsintermediats 8R-HPODE gefunden wurden (vgl. 3.2.5.1).



**Abb.25. Kinetische Analyse der Reaktion von PpoA\_H1004A und 18:2<sup>A9Z,12Z</sup> mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode.** A) Michaelis-Menten-Diagramm, in dem die Geschwindigkeit des initialen Sauerstoffverbrauchs in Abhängigkeit von den verschiedenen 18:2<sup>A9Z,12Z</sup>-Konzentrationen aufgetragen ist. Die Reaktionen erfolgten in Phosphat-Puffer (50 mM, pH 7,2) mit 125 nM PpoA\_H1004A bei 24 °C (siehe 2.3.15.2). B. Hanes-Woolf-Auftragung zur Ermittlung des  $K_M$ - und  $V_{max}$ -Wertes. Die Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus drei Messungen.

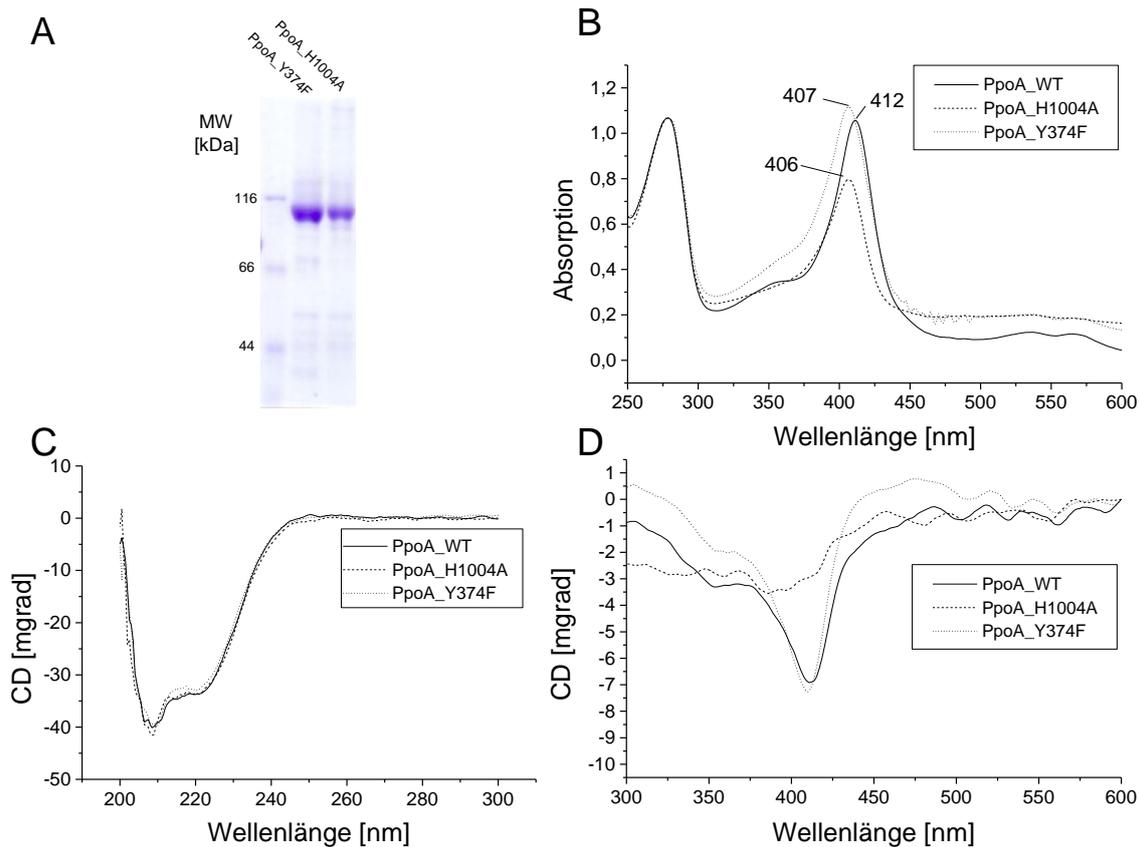
Die Analyse der Peroxidase-Aktivität von PpoA\_H1004A erfolgte, wie in 2.3.13.4 beschrieben, mit Hilfe des kolorimetrischen Peroxidase-Tests nach Kulmacz (1987). Hierbei konnte, wie bereits in Abb. 22 für PpoA\_WT gezeigt, ein charakteristischer Anstieg der Absorption bei 611 nm beobachtet werden. Dies verdeutlicht, dass die Mutation von His-1004 zu Ala zwar einen Einfluss auf die Isomerase-Aktivität (vgl. 3.2.9.1.1) nicht aber auf die Peroxidase-Aktivität von PpoA hat.

#### 3.2.9.1.4 Spektroskopische Analysen von PpoA\_Y374F und PpoA\_H1004A

Um zu untersuchen, ob die veränderten enzymatischen Aktivitäten der beiden PpoA-Varianten PpoA\_Y374F und PpoA\_H1004A auf eine veränderte Proteinfaltung zurückzuführen sind, wurden die beiden Enzyme zunächst nach dem in 2.3.10. beschriebenen Protokoll für PpoA\_WT gereinigt. Die Analyse über SDS-PAGE ist in Abb. 26A dargestellt und zeigt, dass der Reinheitsgrad beider PpoA-Varianten dem von PpoA\_WT entspricht (vgl. mit Abb. 10D). Weiterhin zeigte die Ermittlung der molekularen Masse mittels Größenausschlusschromatographie, dass PpoA\_Y374F und PpoA\_H1004A homotetramere Komplexe bilden. Dies ist ein erstes Indiz dafür, dass die Proteinfaltung dieser Proteine der von PpoA\_WT entspricht. Die UV/vis-Spektren der gereinigten Enzyme wurden in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) bei Raumtemperatur aufgenommen (siehe 2.3.16.1). In Abb. 26B sind die UV/vis-Spektren von PpoA\_Y374F und PpoA\_H1004A im Vergleich zu PpoA\_WT dargestellt. Das UV/vis-Spektrum von PpoA\_Y374F ähnelt dem von PpoA\_WT. So zeigte die Soret-Bande eine leichte Verschiebung in den kurzwelligen Bereich und hat ein Absorptionsmaximum bei 407 nm. Die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\delta$ -Banden weisen die gleichen Maxima wie

PpoA\_WT auf und liegen bei 567 nm ( $\alpha$ ), 534 nm ( $\beta$ ) und 355 nm ( $\delta$ ). Das UV/vis-Spektrum von PpoA\_H1004A zeigt hingegen deutliche Abweichungen zu dem von PpoA\_WT. Die Soret-Bande hat ein Absorptionsmaximum bei 406 nm und die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\delta$ -Banden geben keine distinkten Signale. Der stärkste Unterschied ist das veränderte Verhältnis der Absorption der Soret-Bande zu der Absorption bei 280 nm ( $A_{\text{Soret}}/A_{280 \text{ nm}}$ ). Während die Proteinpräparationen von PpoA\_WT zumeist ein  $A_{\text{Soret}}/A_{280 \text{ nm}}$ -Verhältnis von 1,0-1,1 aufwiesen, zeigte sich für PpoA\_H1004A ein  $A_{\text{Soret}}/A_{280 \text{ nm}}$ -Verhältnis von 0,5-0,7. Damit kann gefolgert werden, dass PpoA\_H1004A nur einen Häm-Gehalt von 50-70 % in Relation zu PpoA\_WT aufweist.

Um die PpoA-Varianten auf ihre korrekte bzw. native Faltung zu untersuchen, wurden zusätzlich Circular dichroismus (CD)-Spektren im nahen und fernen UV-Bereich von PpoA\_WT, PpoA\_Y374F und PpoA\_H1004A in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) bei Raumtemperatur aufgenommen (siehe 2.3.16.2). Die CD-Spektren sind in Abb. 26C dargestellt. Wie zu erkennen ist, weisen beide PpoA-Varianten ähnliche Sekundär- und Tertiärstrukturen, wie PpoA\_WT auf. Damit kann angenommen werden, dass die veränderten katalytischen Aktivitäten nicht durch eine falsche Proteinfaltung hervorgerufen werden. In Abb. 26D sind zudem CD-Spektren im sichtbaren Wellenlängenbereich dargestellt. Wie zu erkennen ist, zeigen PpoA\_WT und PpoA\_Y374F ein deutliches Signal bei 411 nm bzw. 409 nm, das durch die sterische Umgebung des Häm-Moleküls hervorgerufen wird. Interessanterweise zeigt PpoA\_H1004A dieses Signal jedoch nicht und somit kann angenommen werden, dass die Mutation von His-1004 einen Einfluss auf die sterische Umgebung des Häms in der Cytochrom-P450-Domäne hat.

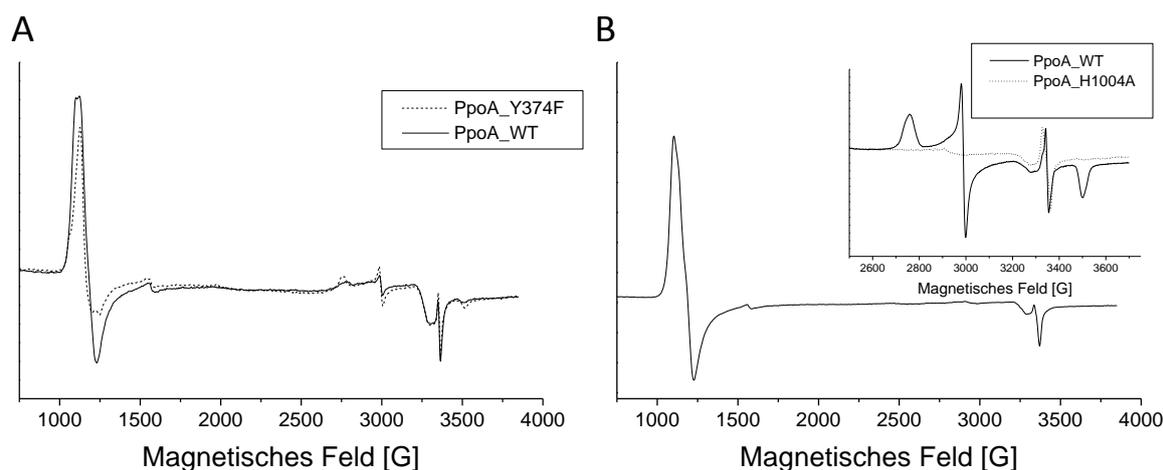


**Abb.26. SDS-PAGE von gereinigtem PpoA\_Y374F und PpoA\_H1004A und spektrale Analyse beider Varianten und von PpoA\_WT.** A. 8%ige SDS-PAGE der gereinigten PpoA-Varianten PpoA\_Y374F und PpoA\_H1004A. B. UV/vis-Spektren der gereinigten PpoA-Varianten in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4). C. CD-Spektren der gereinigten PpoA-Varianten im nahen und fernen UV-Bereich in HEPES (50 mM, pH 7,4). D. CD-Spektren der gereinigten PpoA-Varianten im sichtbaren Wellenlängenbereich. Die Abbildungen sind repräsentativ für Experimente mit zwei verschiedenen Enzympräparationen.

Des Weiteren wurden von beiden Ppo-Varianten (PpoA\_Y374F und PpoA\_H1004A) ESR-Spektren aufgenommen (in Kooperation mit Dr. Alistair Fielding und PD Dr. Marina Bennati, Max Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen; siehe 2.3.16.3). So sollte unter anderem überprüft werden, welche Auswirkungen die Aminosäureaustausche auf die elektronische Umgebung des Häm-Eisens in den verschiedenen Häm-Domänen haben. In Abb. 27A ist das ESR-Spektrum (aufgenommen bei 9,4 GHz und 4 K in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4)) von PpoA\_Y374F im Vergleich zu PpoA\_WT dargestellt. Das Spektrum von PpoA\_Y374F weist die gleichen Signale für den high-spin-Häm-Eisen(III)-Komplex ( $g = 6,0$ ) und den low-spin-Häm-Eisen(III)-Komplex ( $g = 2,44, 2,25$  und  $1,91$ ) auf wie das native Enzym (PpoA\_WT). Somit kann angenommen werden, dass der Verlust der Dioxygenase-Aktivität nicht durch Veränderungen der elektronischen Umgebung des Häm-Kofaktors hervorgerufen wurde.

Dem gegenüber weist das Spektrum von PpoA\_H1004A (aufgenommen bei 9,4 GHz und 4 K in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4)) deutliche Unterschiede zum nativen Enzym auf, wie in Abb. 27B

dargestellt. So können in diesem ESR-Spektrum keine Signale für den low-spin-Eisen(III)-Komplex nachgewiesen werden, während das Signal des high-spin-Häm-Eisen(III)-Komplexes mit dem von PpoA\_WT vergleichbar ist ( $g = 6,0$ ). Auch in dem als Einsatz gezeigten ESR-Spektrum, das bei 20 K und somit nicht sättigenden Aufnahmebedingung für low-spin-Häm-Eisen(III)-Komplexe aufgenommen wurde, sind keine Signale für den low-spin-Häm-Eisen(III)-Komplex identifizierbar, während für PpoA\_WT deutlich die bereits unter 3.2.4.2 beschriebenen charakteristischen Signale erkennbar sind. Die fehlende 8-Hydroperoxid-Isomerase-Aktivität von PpoA\_H1004A könnte durch eine Deformation der Cytochrom-P450-Domäne hervorgerufen werden.



**Abb.27. ESR-Spektren von PpoA\_Y374F und PpoA\_H1004A im Vergleich zu PpoA\_WT.** A. Das ESR-Spektrum von PpoA\_Y374F (gepunktete Linie) zeigt für den low-spin- und high-spin-Häm-Eisen(III)-Komplex die gleichen Signale wie im Fall von PpoA\_WT (feste Linie). B. Das ESR-Spektrum von PpoA\_H1004A zeigt das gleiche Signal für den high-spin-Häm-Eisen(III)-Komplex wie PpoA\_WT. Es sind keine Signale für low-spin-Häm-Eisen(III)-Komplexe erkennbar. Die Spektren wurden bei 9,4 GHz und 4 K in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) aufgenommen. Als Einsatz ist ein ESR-Spektrum von PpoA\_WT und PpoA\_H1004A gezeigt, das bei 20 K aufgenommen wurde. Auch bei dieser Temperatur, konnten für PpoA\_H1004A keine Signale für low-spin-Häm-Eisen(III)-Komplexe nachgewiesen werden, während PpoA\_WT die charakteristischen Signale zeigt, die bereits in 3.2.4.2 beschrieben sind. Die Spektren bei 9,4 GHz und 4 K wurden mit einer Amplitudenmodulation von 4 G und einer Mikrowellenleistung von 1 mW aufgenommen. Die Spektren bei 9,4 GHz und 20 K wurden mit einer Amplitudenmodulation von 7 G und einer Mikrowellenleistung von 0,127 mW aufgenommen (siehe 2.3.16.3). Die Abbildungen sind repräsentativ für zwei verschiedene Enzympräparationen.

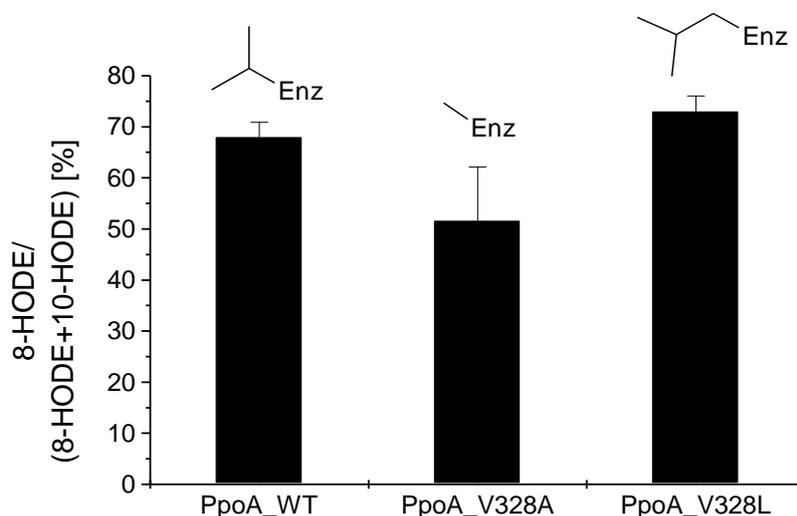
### 3.2.9.2 Mutagenese von regiospezifitätsrelevanten Aminosäuren

Wie in den Aminosäuresequenzvergleichen in Abb. 9 dargestellt, besitzt PpoA in der Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne an Position 328 der Aminosäuresequenz ein Valin, welches in 7,8-LDS (Val-330 in 7,8-LDS aus *G. graminis*) und PGHS (Val-349 in PGHS-1 bzw. Val-334 in PGHS-2 aus *O. aries*) konserviert ist. In Mutagenesestudien konnte gezeigt werden, dass Val-349 in der PGHS-1 unter anderem für die Positionierung der Fettsäure im aktiven Zentrum verantwortlich ist (Thuresson *et al.*, 2001). Außerdem konnte von Garscha und Oliw kürzlich gezeigt werden, dass Val-330 der 7,8-LDS eine wichtige Rolle für die Kontrolle der Fettsäureoxidation an C-8 bzw. C-10 besitzt

(Garscha und Oliw, 2009). Um die Funktion von Val-328 in PpoA zu untersuchen, wurde Val-328 mit Hilfe von Mutagenese-PCR, wie in 2.3.4.2 beschrieben, gegen Alanin bzw. gegen Leucin ausgetauscht. Die beiden so generierten PpoA-Varianten werden, in Analogie zu 3.2.9.1, im Folgenden als PpoA\_V328A bzw. PpoA\_V328L bezeichnet. Nach der Expression in BL21Star (siehe 2.3.9) wurden beide PpoA-Varianten nach dem für PpoA\_WT etablierten Protokoll (siehe 2.3.10) gereinigt.

Für die Analyse wurden 125 nM PpoA\_V328A bzw. PpoA\_V328L mit 0,1 mM 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> für 30 min in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4) bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert und mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.13.1). Anschließend erfolgte die Analyse mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> wie in 2.3.14.5 beschrieben. Die relativen Mengen der beiden Hydroxy-Produkte, 8R-HODE und 10-HODE, wurden durch Integration der korrespondierenden Signale bei *m/z* 295 mit Hilfe der Xcalibur-Software ermittelt. Das Ergebnis ist als Säulendiagramm in Abb. 28 visualisiert.

Inkubationen von PpoA\_WT mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> zeigten, dass es sich bei 68,0 % der gebildeten Hydroxy-Produkte um 8R-HODE handelt, während die übrigen 32 % aus 10-HODE bestanden. Wie zu erkennen ist, führte der Austausch von Val-328 gegen die kleinere Aminosäure Alanin (PpoA\_V328A) zu einer vermehrten Bildung von 10-HODE (51,6 %) und einem Rückgang an gebildeten 8R-HODE (48,4 %). Der Austausch von Val-328 gegen die größere Aminosäure Leucin hingegen erhöhte die Bildung von 8R-HODE leicht (73 %) und führte zu einer geringeren Bildung an 10-HODE (27 %).



**Abb.28. Analyse der durch PpoA\_WT, PpoA\_V328A bzw. PpoA\_V328L gebildeten relativen Mengen an 8R-HODE.** Für die Messung wurden 125 nM PpoA\_WT, PpoA\_V328A und PpoA\_V328L für 30 min bei Raumtemperatur mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> schüttelnd inkubiert, mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.13.1) und anschließend mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> analysiert (siehe 2.3.14.5). Die relativen Mengen an 8R-HODE und 10-HODE wurden durch Integration der korrespondierenden Signale bei *m/z* 295 mit Hilfe der Xcalibur-Software bestimmt. Über jeder Säule ist der Aminosäurerest an Position 328 der jeweiligen PpoA-Variante dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden anhand von drei Messungen ermittelt.

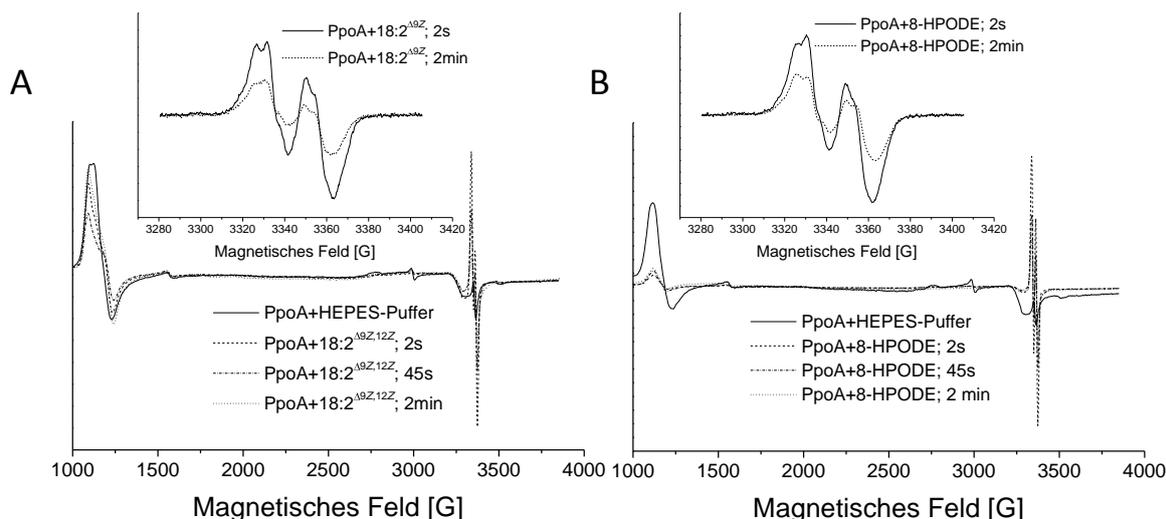
### 3.2.10 Analyse substratinduzierter Proteinradikale

Wie in 3.1 beschrieben ist das katalytische Tyrosin der PGHS (Tyr-385 von PGHS-1 aus *O. aries*) auch in der PpoA-Sequenz konserviert (Tyr-374). Es wird vermutet, dass an diesem Tyrosin während der Reaktion von PGHS und 20:4<sup>Δ5Z,8Z,11Z,14Z</sup> ein Tyrosyl-Radikal gebildet wird, welches für die Abstraktion eines spezifischen Wasserstoffs von der Fettsäure verantwortlich ist (Smith *et al.*, 2000). Wie in 3.2.9.1.1 beschrieben, zeigte die PpoA-Variante, in der das entsprechende Tyrosin gegen Phenylalanin ausgetauscht war (PpoA\_Y374F), keine Dioxygenase-Aktivität und konnte 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> nicht zu 8R-HPODE oxidieren (Abb. 23D). Um zu untersuchen, ob PpoA ebenfalls ein Tyrosyl-Radikal für die Oxidation von 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> verwendet, sollte die Existenz von substratinduzierten Proteinradikalen im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Alistair Fielding und PD Dr. Marina Bennati (Max Planck Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen) mittels ESR-Analysen näher untersucht werden. Hierzu wurde gereinigtes PpoA (250 μM bzw. 197 μM in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4)) für 2 s, 45 s und 2 min mit einem 20-40fachen Überschuss an 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> und 8R-HPODE auf bei 4 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff beendet. Anschließend erfolgte die Analyse am ESR-Spektrometer (siehe 2.3.16.3).

In Abb. 29 sind die erhaltenen ESR-Spektren von PpoA für die Reaktion mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> (Abb. 29A) und 8R-HPODE (Abb. 29B) für die verschiedenen Zeitpunkte dargestellt. Die ESR-Analyse erfolgte bei 9,4 GHz und 4 K. Außerdem wurden ESR-Spektren bei 9,4 GHz und 110 K aufgenommen, da bei dieser Temperatur die ESR-Analyse des Radikals unter nicht sättigenden Aufnahmebedingungen erfolgte. Diese Spektren sind als Einsätze dargestellt.

Für die Reaktion mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> zeigte sich innerhalb von 2 s eine deutliche Zunahme bei  $g = \sim 2,004$ , die auf die Bildung eines organischen Radikals hindeutet. Mit zunehmender Reaktionsdauer wurde eine Abnahme der Intensität dieses Signals beobachtet. Weiterhin konnte während der Inkubation eine Abnahme des high-spin-Häm-Eisen(III)-Signals ( $g = 6,0$ ) beobachtet werden (siehe Abb. 29A). Analog konnte für die Reaktion von PpoA mit 8R-HPODE ebenfalls nach 2 s Inkubation eine Zunahme bei  $g = \sim 2,004$  verzeichnet werden. Außerdem wurde nach dieser Zeit eine deutliche Abnahme der Intensität des high-spin-Häm-Eisen(III)-Signals ( $g = 6,0$ ) beobachtet, das nach 45 s wieder anzusteigen schien (siehe Abb. 29B).

Im Bereich der low-spin-Häm-Eisen(III)-Signale führten die Inkubationen mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> bzw. 8R-HPODE nur zu kleinen undeutlichen Veränderungen des Signals (Daten nicht gezeigt).



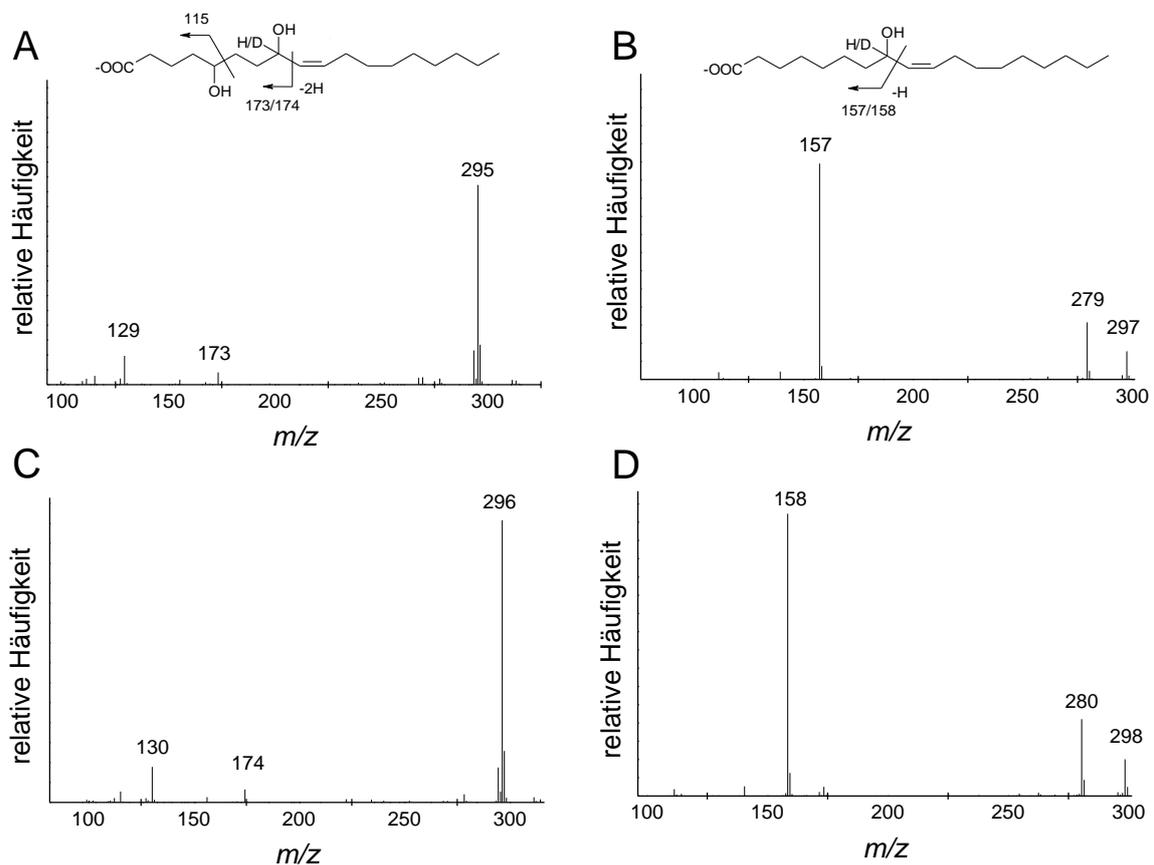
**Abb.29. ESR-Spektren von PpoA nach der Inkubation mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> (A) bzw. 8R-HPODE (B).** Für die Analyse wurden 250 μM PpoA bzw. 197 μM PpoA mit einem 20fachen Überschuss an 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> bzw. 8R-HPODE für 2 s, 45 s und 2 min bei 4 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Einfrieren der Probe in flüssigem Stickstoff gestoppt (siehe 2.3.16.3). Es zeigte sich eine Signalzunahme bei  $g \sim 2,004$ . Die Spektren wurden bei 9,4 GHz und 4 K mit einer Amplitudenmodulation von 4 G und einer Mikrowellenleistung von 1 mW aufgenommen. Die als Einsatz gezeigten Spektren wurden bei 9,4 GHz und 110 K mit einer Amplitudenmodulation von 3 G und einer Mikrowellenleistung von 0,0127 mW aufgenommen (siehe 2.3.16.3).

Bei der gleichen Analyse mit PpoA\_Y374F konnte keine Intensitätszunahme bei  $g \sim 2,0$  beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Damit kann angenommen werden, dass es sich bei dem beobachteten Radikal tatsächlich um ein Tyrosyl-Radikal handelt. Um die Identität des Tyrosyl-Radikals eindeutig zu belegen, sind in der Zukunft weitere Analysen bei höheren Frequenzen nötig.

### 3.2.11 Untersuchungen des kinetischen Isotopie-Effekts (KIE)

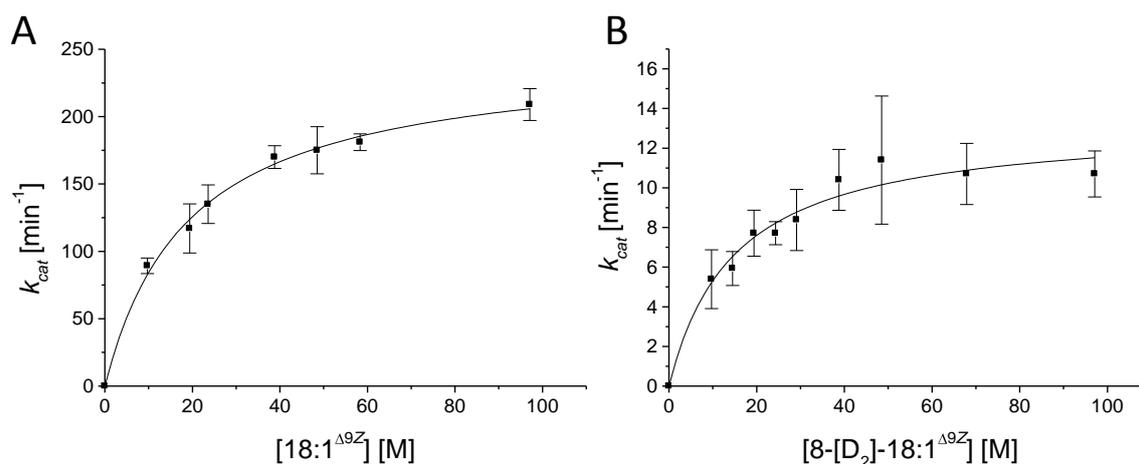
In dem vorliegenden Versuch sollte der Reaktionsmechanismus von PpoA kinetisch näher untersucht werden. Die bisher erhaltenen Ergebnisse führten zu der Vermutung, dass PpoA während der Reaktion ein Tyrosyl-Radikal bildet, welches für die Abspaltung eines Wasserstoffatoms und Bildung eines kohlenstoffzentrierten Radikals am Fettsäurerückgrat verantwortlich ist. Um diese Hypothese näher zu untersuchen und außerdem Informationen über den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Reaktion zu erhalten, sollte der kinetische Isotopie-Effekt (KIE) für die Reaktion von PpoA mit 18:1<sup>Δ9Z</sup> analysiert werden. Hierzu wurden kinetische Analysen an der Sauerstoffelektrode durchgeführt, wie sie unter 2.3.17 beschrieben wurden. Als Substrat diente zum einen 18:1<sup>Δ9Z</sup> sowie am C-8 deuterierte 18:1<sup>Δ9Z</sup> (8-[D<sub>2</sub>]-18:1<sup>Δ9Z</sup>). Letztere wurde von André Nadler (Institut für organische und biomolekulare Chemie, Universität Göttingen) synthetisiert.

Zunächst wurde untersucht, ob während der Reaktion von PpoA mit 18:1<sup>Δ9Z</sup> ein Wasserstoffatom am C-8 des Fettsäurerückgrats abgespalten wird. Hierzu wurde 100 μM PpoA mit 0,1 mM 18:1<sup>Δ9Z</sup> bzw. 0,1 mM 8-[D<sub>2</sub>]-18:1<sup>Δ9Z</sup> in Tris/Maleat-Puffer (50 mM, pH 7,3), wie unter 2.3.13.1 beschrieben, bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert und anschließend mit Diethylether extrahiert. Es folgte die Produktanalyse mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> (siehe 2.3.14.5). In Abb. 30 sind die korrespondierenden Tandem-MS-Spektren von 5,8-DiHOME und 8-HOME dargestellt, die von 18:1<sup>Δ9Z</sup> (Abb. 30A und 30B) und 8-[D<sub>2</sub>]-18:1<sup>Δ9Z</sup> (Abb. 30C und 30D) ausgehend während der Inkubation gebildet wurden. Zusätzlich ist über den jeweiligen Tandem-MS-Spektren ein charakteristisches Fragmentationmuster des Produkts dargestellt (vgl. 3.2.5.3). Die aus 18:1<sup>Δ9Z</sup> und 8-[D<sub>2</sub>]-18:1<sup>Δ9Z</sup> gebildeten Produkte zeigen charakteristische Signale, deren *m/z*-Quotient sich in einem Wert von 1 unterscheiden. Es zeigt sich somit, dass während der Reaktion ein Wasserstoff- bzw. ein Deuteriumatom am C-8 des Fettsäurerückgrats abgespalten wird.



**Abb.30. Tandem-MS-Spektren der aus 18:1<sup>Δ9Z</sup> bzw. 8-[D<sub>2</sub>]-18:1<sup>Δ9Z</sup> von PpoA gebildeten Produkte.** Für die Analyse wurden 100 μM des Substrates mit 100 nM PpoA in Tris/Maleat-Puffer (50 mM, pH 7,3) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.13.1). Die Analyse der gebildeten Produkte erfolgte mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> (siehe 2.3.14.5). A-D. Tandem-MS-Spektrum von 5,8-DiHOME (A), 8R-HOME (B), [8-D]-5,8-DiHOME (C), [8-D]-8R-HOME (D). Die Tandem-MS-Spektren zeigen typische Signale für 8-HOME und 5,8-DiHOME (vgl. 3.2.5.3); die Signale der deuterierten Produkte weisen einen um 1 größeren *m/z*-Quotienten auf als die nicht markierten Produkte. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für zwei verschiedene Messungen.

In dem folgenden Versuch wurde der Einfluss des Austauschs von Wasserstoff gegen Deuterium auf die Reaktionskinetik analysiert. Hierzu wurde der initiale Sauerstoffverbrauch bei verschiedenen Substratkonzentrationen in Tris/Maleat-Puffer (50 mM, pH 7,3) bei 18 °C gemessen (siehe 2.3.17). Aus dem Sauerstoffverbrauch wurde die Wechselzahl  $k_{cat}$  bestimmt, die in Abb. 30A in Abhängigkeit der eingesetzten Substratkonzentration grafisch dargestellt ist. Die Bestimmung der Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  und der maximalen Wechselzahl  $k_{cat}$  erfolgte durch eine hyperbole Ausgleichsrechnung mit der Software Origin 6.0.



**Abb.31. Auftragung der aus dem initialen Sauerstoffverbrauch errechneten Wechselzahl  $k_{cat}$  in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration.** Die Reaktion erfolgte in Tris/Maleat-Puffer (50 mM, pH 7,3) bei 18 °C und wurde durch die Zugabe von 100 nM PpoA gestartet (siehe 2.3.17). Aus dem initialen Sauerstoffverbrauch wurde die Wechselzahl  $k_{cat}$  berechnet. A. Auftragung von  $k_{cat}$  in Abhängigkeit von der 18:1<sup>Δ9Z</sup>-Konzentration. B. Auftragung von  $k_{cat}$  in Abhängigkeit von der 8-[D<sub>2</sub>]-18:1<sup>Δ9Z</sup>-Konzentration. Die Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus drei verschiedenen Messungen.

Es zeigte sich, dass der Austausch der Wasserstoffatome am C-8 der 18:1<sup>Δ9Z</sup> gegen Deuteriumatome keinen großen Einfluss auf die Michaelis-Konstante hat. So ergab die Reaktion mit 18:1<sup>Δ9Z</sup> einen  $K_M$ -Wert von 19,2 μM, während für die Reaktion mit 8-[D<sub>2</sub>]-18:1<sup>Δ9Z</sup> ein  $K_M$ -Wert von 15 μM beobachtet wurde. Dementgegen zeigte der Isotopenaustausch erhebliche Auswirkungen auf die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs. Für die Reaktion mit 18:1<sup>Δ9Z</sup> ergab sich ein maximaler  $k_{cat}$ -Wert von 246,1 min<sup>-1</sup>, während für die Reaktion mit 8-[D<sub>2</sub>]-18:1<sup>Δ9Z</sup> ein maximaler  $k_{cat}$ -Wert von 14,3 min<sup>-1</sup> beobachtet wurde. Damit ergibt sich folgender *KIE* für die Gesamtreaktion des Sauerstoffverbrauchs:

$$KIE = \frac{k_{cat}^H}{k_{cat}^D} = \frac{246,1 \text{ min}^{-1}}{14,3 \text{ min}^{-1}} = 17,0$$

Da an dem C-8 des Substrats beide Wasserstoffatome durch Deuterium substituiert waren, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem ermittelten Wert um eine Kombination eines primären und sekundären Isotopieeffekts handelt. Für sekundäre *KIE* sind Werte von  $k_H/k_D = 1,02-1,40$  bekannt (Laidler und Bunting, 1973, Kuby, 1990). Unter Berücksichtigung des maximalen Wertes von  $k_H/k_D = 1,40$  ergibt sich dann ein primärer *KIE* von:

$$KIE_{\text{primär}} = \frac{17,0}{1,4} = 12,2$$

Die Werte für klassische primäre *KIE* liegen normalerweise zwischen  $k_H/k_D = 2$  und  $k_H/k_D = 10$  (Laidler und Bunting, 1973, Kuby, 1990). Der für die Reaktion von PpoA ermittelte Wert erscheint größer als die bisher bekannten Werte zu sein. Dies könnte auf eine multiplikativen Erhöhung des Isotopie-Effektes oder auf einen Tunneleffekt hindeuten.

### **3.3 Biochemische Charakterisierung von PpoC**

Die biochemische Charakterisierung von PpoC ist teilweise mit Stefan Schneider im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt worden. Die mit ihm generierten Daten sind in seiner Diplomarbeit beschrieben und werden daher im Folgenden nicht dargestellt, sondern lediglich an den jeweiligen Stellen kurz zusammengefasst beschrieben. Für nähere Informationen wird auf die Diplomarbeit verwiesen (Schneider, Diplom 2009).

#### **3.3.1 Klonierung von PpoC**

*PpoC* ist zunächst in den Hefektor pYES2 kloniert worden (Govindarajan, Master thesis 2005). Für die Klonierung in einen bakteriellen Expressionsvektor wurde *ppoC* wie in 2.3.4.1 beschrieben über PCR von dem pYES2/*ppoC*-Plasmid amplifiziert. Die verwendeten Primer und die DNA-Sequenz von *ppoC* sind im Anhang aufgeführt. Die Klonierung von *ppoC* in den Expressionsvektor pET24a erfolgt wie in 2.3.7.1 beschrieben über eine Zwischenklonierung in den pJET2.1-Vektor. Das so erhaltene Plasmid wurde in den *E. coli*-Stamm XL1Blue transformiert (siehe 2.3.2.2) und anschließend amplifiziert. Das *ppoC*-Fragment konnte über an die Primer angehängte Schnittstellen *NdeI* und *NotI* ausgeschnitten werden (siehe 2.3.7.3) und in den, mit den gleichen Enzymen geschnittenen pET24-Vektor ligiert werden (siehe 2.3.7.2). Der offene Leserahmen mit 3933 Basenpaaren und 1117 Aminosäuren wurde durch die Sequenzierung (siehe 2.3.5) des pET24/*ppoC*-Plasmids bestätigt. Es zeigte sich, dass die Proteinsequenz von der publizierten Genom-Sequenz (Galagan *et al.*, 2005)

abwich und hier Ser-215 durch Pro ersetzt war. Die Expression von PpoC ohne Fusion eines angehängten Hexahistidin-Peptids erfolgte in *E. coli* BL21Star, da vorangegangene Arbeiten bereits gezeigt hatten, dass die Expression von PpoA in Fusion mit einem Hexahistidin-Peptid lediglich zur Expression inaktiven Enzyms führte (siehe 3.2.1). Die höchste Proteinexpression wurde durch die Kultivierung der Zellen bei 16 °C für 3 d erzielt. Die Kultivierung der Expressionszellen für 3 h bei 37 °C bzw. für 18 h bei 28 °C führte zwar zu einer Expression von PpoC, doch lag das exprimierte Protein lediglich in bakteriellen Einschlusskörpern vor. Die externe Zugabe von  $\delta$ -Aminolävulinsäure und Eisenammoniumcitrat zum Zeitpunkt der Proteininduktion mit 0,1 mM IPTG erhöhte die PpoC-Expression, wie bereits oben für die Expression von PpoA beschrieben (Daten nicht gezeigt). Weiterhin zeigte sich, dass die Koexpression der Chaperone groES und groEL außerdem zu einer deutlichen Steigerung der PpoC-Expression führte (Schneider, Diplom 2009). Die Expression von PpoC wurde über SDS-PAGE (siehe 2.3.11) nachgewiesen und Aktivitätstests an der Sauerstoffelektrode (siehe 2.3.15.2) wurden durchgeführt.

### 3.3.2 Proteinreinigung

Die Reinigung von PpoC erfolgte über ein Reinigungsprotokoll, das im Wesentlichen dem oben beschriebenen Protokoll für die PpoA-Reinigung entspricht (siehe 3.2.2). Es wurde zusammen mit Stefan Schneider im Rahmen seiner Diplomarbeit etabliert und ist in der Diplomarbeit beschrieben (Schneider, Diplom 2009). Es konnte beobachtet werden, dass gereinigtes PpoC äußerst instabil ist und seine katalytische Aktivität innerhalb von Minuten bis zu wenigen Stunden verliert. Der Zusatz von 10 % Glycerin oder EDTA zum Puffer zeigte keine stabilitätserhöhende Wirkung. Die Analyse der molekularen Masse von PpoC mittels Größenausschlusschromatographie unter Verwendung der Superdex-S200pg-Gelfiltrationssäule zeigte, dass PpoC wie auch PpoA als homotetramerer Proteinkomplex vorliegt (vgl. 3.2.3).

### 3.3.3 Spektrale Analyse

Ein UV/vis-Spektrum des gereinigten Proteins ist in der Diplomarbeit von Stefan Schneider dargestellt (Schneider, Diplom 2009). Es wies ein deutliches Absorptionsmaximum bei 403 nm auf. Weitere schwache Signale waren bei 530 nm und bei 630 nm erkennbar. Die Signale deuten auf die Bindung von Häm hin; das Signal bei 630 nm ist charakteristisch für high-spin-Häm-Eisen(III)-Komplexe. Das Häm-Absorptionsspektrum erschien von äußerst geringer Intensität und wies ein  $A_{\text{Soret}}/A_{280}$ -Verhältnis

von etwa 0,1-0,3 auf. Es kann angenommen werden, dass Häm nicht kovalent an das Protein gebunden war und während der Proteinreinigung teilweise verloren ging.

### 3.3.4 Analyse der gebildeten Produkte

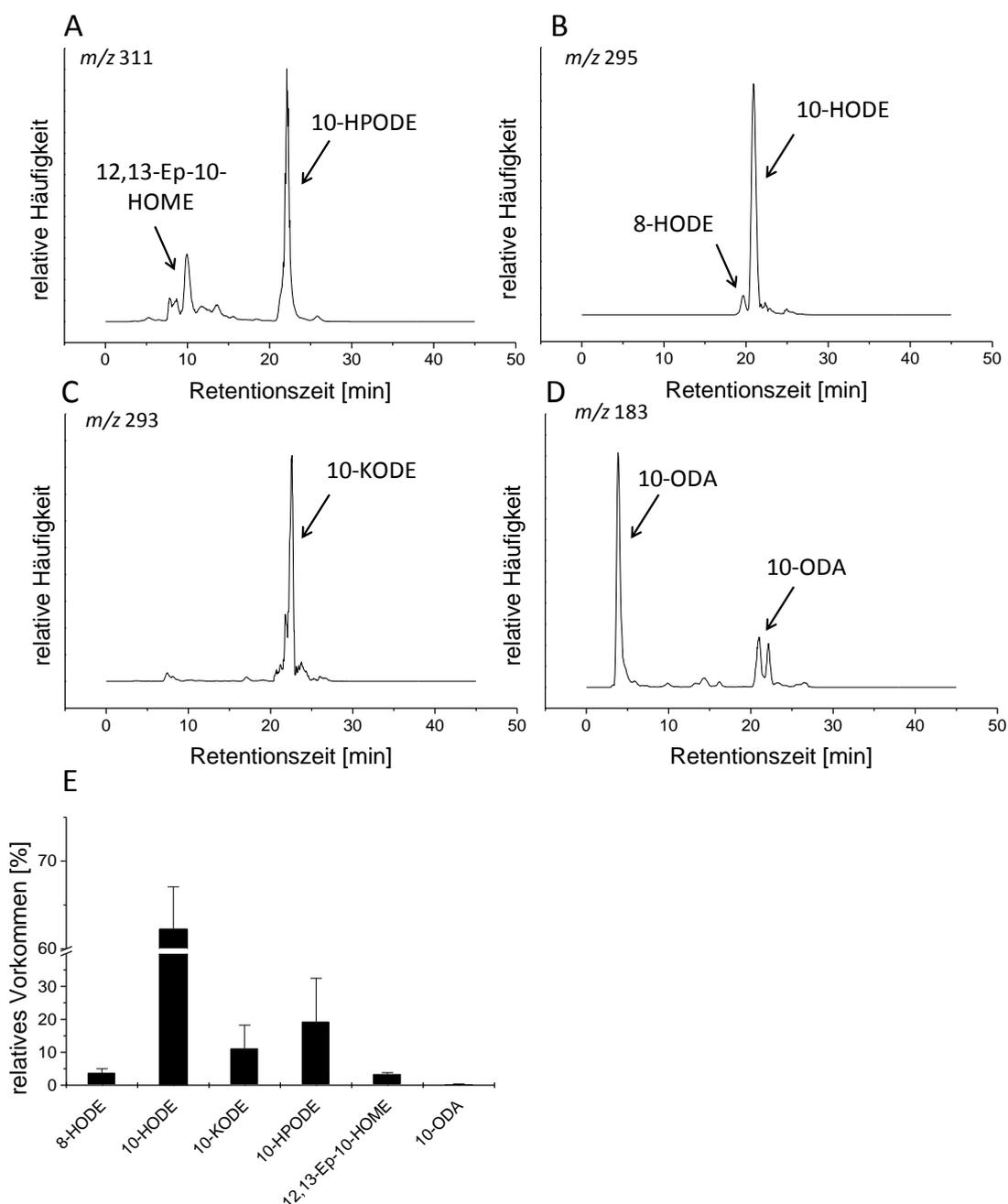
Die Analyse der gebildeten Produkte erfolgte mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> nach der gleichen Methode, wie sie für die Identifikation der von PpoA gebildeten Produkte etabliert und in 2.3.14.5 beschrieben ist. Da gereinigtes PpoC unter den verwendeten Isolationsbedingungen sehr instabil war, wurden die Inkubationen zur Produktanalyse mit Zellextrakt PpoC-exprimierender *E. coli*-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden wie in 2.3.8 beschrieben kultiviert und geerntet. Der Zellaufschluss erfolgte in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 8,0) wie in 2.3.9 beschrieben. Nach Zentrifugation der Zelltrümmer wurde der Zellextrakt mit 0,1 mM Fettsäure für 60 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert und mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.13.1). Parallel fanden zur Kontrolle stets Inkubationen mit Zellextrakt von *E. coli*-Zellen statt, die den leeren Vektor trugen und unter identischen Bedingungen kultiviert wurden.

Exemplarisch werden im Folgenden zunächst die Daten gezeigt, die durch Inkubationen von 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> mit PpoC und der anschließenden Analyse an der RP-HPLC/MS<sup>2</sup> erhalten wurden. In Abb. 32 sind auf verschiedene charakteristische *m/z*-Quotienten extrahierte Ionenchromatogramme dargestellt. Ein *m/z*-Quotient von 311 entspricht der molekularen Masse von 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> zuzüglich zweier Sauerstoffatome und abzüglich eines Protons. Vergleichbar stimmt ein *m/z*-Quotient von 295 bzw. 293 mit der molekularen Masse von 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> zuzüglich eines Sauerstoffatoms und abzüglich eines Protons bzw. dreier Protonen überein.

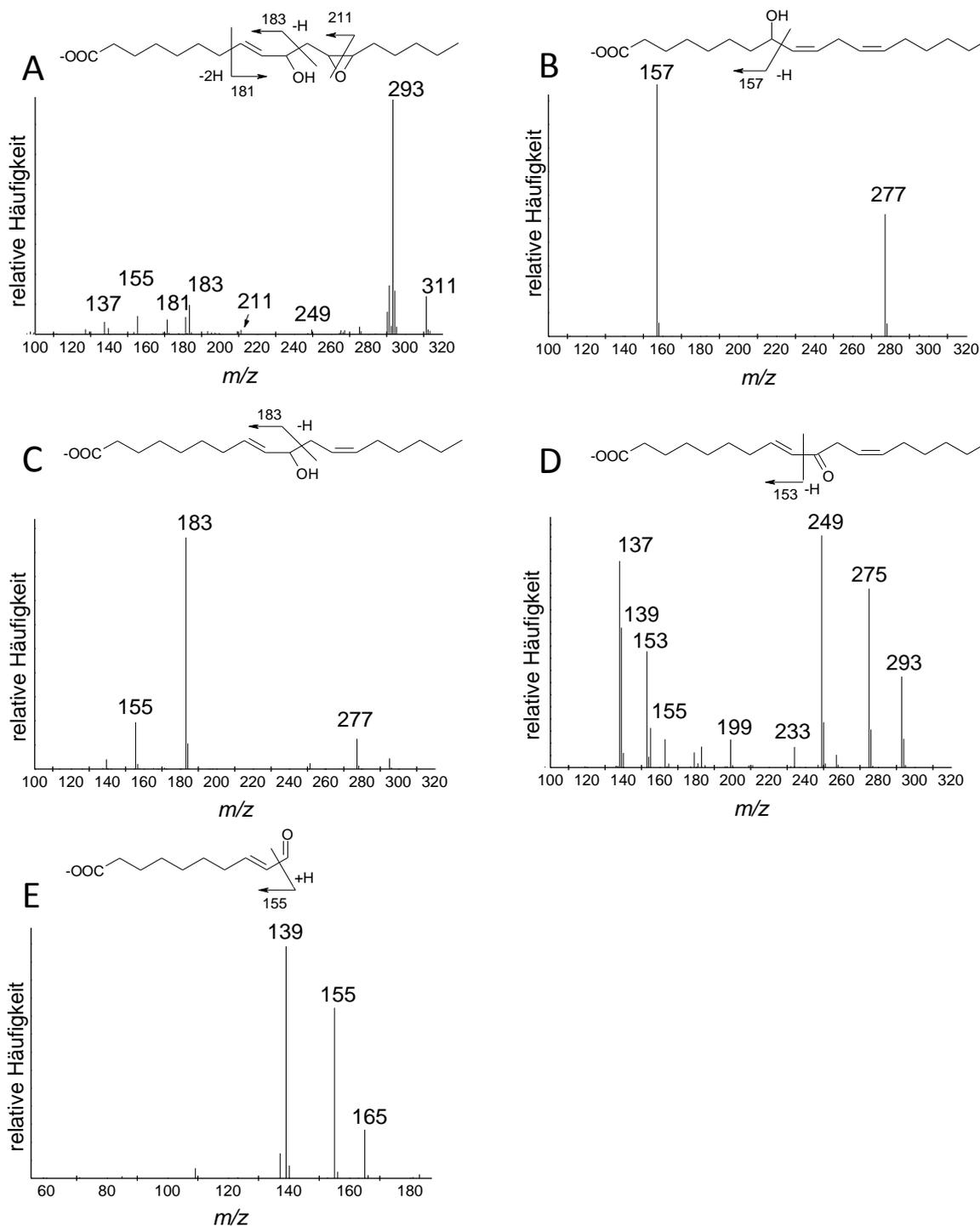
Wie zu erkennen ist, sind in dem auf *m/z* 311 extrahierten Ionenchromatogramm (siehe Abb. 32A) zwei deutliche Signale bei einer Retentionszeit von 9,9 min und 22,1 min zu erkennen. Das korrespondierende Tandem-MS-Spektrum des Signals mit einer Retentionszeit von 9,9 min ist in Abb. 33A mit einem möglichen Fragmentationmuster dargestellt. Das gezeigte Fragmentationmuster stimmt mit dem Fragmentationmuster von 12,13-Ep-10-HOME überein, das bereits in Abschnitt 3.2.6.3 beschrieben wurde. Bei dem nach 21,1 min eluierten Produkt, handelt es sich um 10-HPODE. Das Tandem-MS-Spektrum dieses Produkts weist nur ein Signal eines Fragmentions auf, das durch Abspaltung von Wasser entstanden ( $M^- - 18$ ) und hier deshalb nicht dargestellt ist (vgl. hierzu auch 3.2.5.3). In Abb. 32B ist ein auf *m/z* 295 extrahiertes Ionenchromatogramm dargestellt. Es ist ein schwaches Signal bei 19,6 min und ein starkes Signal bei 20,8 min erkennbar. Die korrespondierenden Tandem-MS-Spektren sind in Abb. 33B und 33C mit möglichen Fragmentationmuster dargestellt. Die Fragmentationmuster entsprechen denen von 8*R*-HODE bzw. 10-HODE, die bereits in 3.2.5.3 beschrieben und dargestellt wurden (vgl. auch (Garscha *et al.*, 2007, Garscha und Oliw, 2007)). Das

auf  $m/z$  293 extrahierte Ionenchromatogramm zeigt, wie in Abb. 32C abgebildet, ein deutliches Signal bei einer Retentionszeit von 22,5 min, dessen Tandem-MS-Spektrum in Abb. 33D dargestellt ist. Das Fragmentationmuster ist charakteristisch für 10-Keto-9Z,12Z-octadecadiensäure (10-KODE), wie bereits von Garscha und Oliw gezeigt (Garscha *et al.*, 2007). Zusätzlich konnte die Bildung eines weiteren Produkts mit  $m/z$  183 beobachtet werden. Wie in dem auf  $m/z$  183 extrahierten Ionenchromatogramm zu erkennen ist, eluierte dieses Produkt bei einer Retentionszeit von 3,8 min (siehe Abb. 32D). Ein weiteres Signal ist bei einer Retentionszeit von 21,2 min sichtbar. Das korrespondierende Tandem-MS-Spektrum beider Signale ist in Abb. 33E abgebildet und zeigt ein Fragmentationmuster, das charakteristisch für 10-Oxo-8-decensäure (10-ODA) ist (Garscha *et al.*, 2007).

Für einen Vergleich der relativen Mengen an gebildeten Produkten wurden die entsprechenden Signale mit Hilfe der Xcalibur-Software integriert und in Relation gesetzt. Wie in Abb. 32E gezeigt, ist 10-H(P)ODE das Hauptprodukt der Reaktion (62,3 % 10-HODE zuzüglich 19,2 % 10-HPODE). Bei dem von PpoC gebildeten 12,13-Ep-10-HOME handelt es sich scheinbar nur um ein Nebenprodukt der Reaktion (3,3 %). Die geringen Mengen an 10-ODA (0,13 %) zeigen gleichfalls, dass es sich hierbei um ein Nebenprodukt handelt.



**Abb.32. RP-HPLC/MS<sup>2</sup>-Analyse der bei der Umsetzung von 18:2<sup>Δ<sup>9</sup>,<sup>12</sup>Z</sup> durch PpoC gebildeten Produkte.** Für die Analyse wurde Zellextrakt PpoC-exprimierender *E. coli*-Zellen (in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) mit 0,1 mM 18:2<sup>Δ<sup>9</sup>,<sup>12</sup>Z</sup> bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert (siehe 2.3.13.1). Die Fettsäure und die gebildeten Produkte wurden anschließend mit Diethylether extrahiert und mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> analysiert (siehe 2.3.14.5). A. Auf *m/z* 311 extrahiertes Ionenchromatogramm zum Nachweis von 12,13-Ep-10-HOME (9,9 min) und 10-HPODE (21,1 min). B. Auf *m/z* 295 extrahiertes Ionenchromatogramm zum Nachweis von 8H-HODE (19,6 min) und 10-HODE (20,8 min). C. Auf *m/z* 293 extrahiertes Ionenchromatogramm zum Nachweis von 10-KODE (22,5 min). D. Auf *m/z* 183 extrahiertes Ionenchromatogramm zum Nachweis von 10-ODA. Während der Inkubation gebildetes 10-ODA eluierte bei 3,7 min, während 10-ODA, das im Massenspektrometer gebildet wurde, zusammen mit 10-HPODE bei 21,1 min eluierte. E. Relative Mengen der gebildeten Produkte. Die Mengen wurden über die Integration der korrespondierenden Signalfächen bei den jeweiligen *m/z*-Quotienten mit Hilfe der Xcalibur-Software bestimmt und in Relation gesetzt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus drei unabhängigen Messungen. KODE, Ketoctadecadiensäure; 10-ODA, 10-Oxo-8-decensäure, 12,13-Ep-10-HOME, 12,13-Epoxy-10-hydroxyoctadecensäure; H(P)ODE, Hydro(pero)xyoctadecadiensäure. Es handelt sich um repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Messungen.



**Abb.33. RP-HPLC/MS<sup>2</sup>-Analyse der von 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> und PpoC gebildeten Produkte.** Zellextrakt PpoC-exprimierender *E. coli*-Zellen wurden mit 0,1 mM 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> schüttelnd wie in 2.3.13.1 beschrieben inkubiert und mit Diethylether extrahiert. Die RP-HPLC-Analyse erfolgte wie in 2.3.14.5 beschrieben. A-E Tandem-MS-Spektren und mögliche Fragmentationmuster von 12,13-Ep-10-HOME (A), 8R-HODE (B), 10-HODE (C), 10-KODE (D) und 10-ODA (E). KODE, Ketoctadecadiensäure; 10-ODA, 10-Oxo-8-decensäure, 12,13-Ep-10-HOME, 12,13-Epoxy-10-hydroxyoctadecensäure; H(P)ODE, Hydro(pero)xyoctadecadiensäure. Es handelt sich um repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Messungen.

Es wurde bereits mehrfach berichtet, dass 10-ODA als ein Spaltprodukt der sogenannten  $\beta$ -Spaltung von 10-HPODE entstehen kann - eine Reaktion, die durch bisher unbekannte Lyasen und Metallo-Enzyme bzw. Metall-Kationen katalysiert wird (Labeque und Marnett, 1987). Das Signal bei einer Retentionszeit von 3,8 min entspricht dem bei der Inkubation so gebildeten 10-ODA, während das Signal mit einer Retentionszeit von 21,1 min auf einen Zerfall von 10-HPODE zu 10-ODA hindeutet, der durch die Messbedingungen im Massenspektrometer hervorgerufen wird (Garscha *et al.*, 2007). Als weitere Produkte der  $\beta$ -Spaltung von 10-HPODE wurden zudem flüchtige Octenol-Isomere beschrieben (Wurzenberger und Grosch, 1984b, Wurzenberger und Grosch, 1984a, Wurzenberger und Grosch, 1984c). Um zu untersuchen, ob derartige Verbindungen bei der Reaktion von PpoC mit  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  ebenfalls entstehen, wurde zusammen mit Stefan Schneider die Gasphase über dem Reaktionsgemisch mittels Festphasenmikroextraktion und GC/MS analysiert. Die Produkte wurden mit Hilfe der NIST-Datenbank und bereits bekannter EI-MS-Spektren identifiziert (Wichard *et al.*, 2005, Senger *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass während der Reaktion von Zellextrakt PpoC-exprimierender *E. coli*-Zellen mit  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  die folgenden flüchtigen Octen-Isomere gebildet wurden: 1-Octen-3-ol, 2-Octen-1-ol, 3-Octenon und 2-Octenal. Die generierten Massenspektren sind in der Diplomarbeit von Stefan Schneider abgebildet (Schneider, Diplom 2009).

Weiterhin wurde zusammen mit Stefan Schneider untersucht, welche Produkte von anderen Fettsäuren gebildet werden. Das Interesse lag hier vor allem auf Fettsäuren, die auch endogen in *A. nidulans* vorkommen. Aus diesem Grund wurden  $18:1^{\Delta 9Z}$   $18:3^{\Delta 9Z,12Z,15Z}$  als Substrate getestet. Hierbei zeigte sich interessanterweise, dass  $18:1^{\Delta 9Z}$  vornehmlich am C-8 oxidiert und 8R-H(P)ODE als Produkt gebildet wurde. Als weitere Produkte dieser Reaktion wurden 10-H(P)OME und die beiden flüchtigen Substanzen 1-Octanol, 2-Undecenal identifiziert (siehe Tab. 6). Die korrespondierenden Tandem-MS-Spektren und EI-MS-Spektren sind in der Diplomarbeit von Stefan Schneider dargestellt (Schneider, Diplom 2009).  $18:3^{\Delta 9Z,12Z,15Z}$  wurde, wie auch  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$ , vornehmlich am C-10 oxidiert und 10-H(P)OTE wurde gebildet. Als weitere Produkte wurde 8-H(P)OTE sowie die Dicarbonsäure 2E-Decendisäure gebildet. Außerdem konnte die Bildung von zwei flüchtigen Substanzen beobachtet werden, die nicht mit Hilfe der NIST-Datenbank identifiziert werden konnten. Inkubationen mit  $[^{13}\text{C}_{18}]$ - $18:3^{\Delta 9Z,12Z,15Z}$  führten zu dem Schluss, dass es sich hierbei um Octadien-Isomere handelt (siehe Tab. 6). Die korrespondierenden Tandem-MS-Spektren sowie die EI-MS-Spektren sind in der Diplomarbeit von Stefan Schneider dargestellt (Schneider, Diplom 2009).

Die folgende Tabelle fasst die identifizierten Produkte zusammen:

**Tab.6: Produkte der Reaktion von PpoC mit verschiedenen ungesättigten Fettsäuren.** Die Fettsäuren (0,1 mM) wurden mit Zellextrakt PpoC-exprimierender *E. coli*-Zellen bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert und mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.13.1). Die Produkte wurden mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> (siehe 2.3.14.5) und Detektion charakteristischer Signale identifiziert (8-Hydroxy-Fettsäurederivate mit *m/z* 157 (Spaltung zwischen C-8 und C-9) und 10-Hydroxy-Fettsäurederivate mit *m/z* 183 (Spaltung zwischen C-10 und C-11). Flüchtige Produkte wurden über der Gasphase des Reaktionsgemisches mittels Festphasenmikroextraktion extrahiert und über GC/MS analysiert (siehe 2.3.14.4). Die Identifikation erfolgte mit Hilfe der NIST-Datenbank und dem Vergleich mit bereits bekannter EI-MS-Spektren (Wichard *et al.*, 2005, Senger *et al.*, 2005). Die folgenden Abkürzungen wurden verwendet: H(P)OME, Hydro(pero)xyoctadecensäure; H(P)ODE, Hydro(pero)xyoctadecadiensäure; H(P)OTE, Hydro(pero)xyoctadecatriensäure; KODE, Ketoctadecadiensäure; 10-ODA, 10-Oxo-8-decensäure, 12,13-Ep-10-HOME, 12,13-Epoxy-10-hydroxyoctadecensäure. Es handelt sich um repräsentative Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Messungen.

Substrate	Hydroperoxid- Produkte	Vom Hydroperoxid abgeleitete Produkte	Flüchtige Produkte
18:1 <sup>Δ9Z</sup>	8-HPOME  10-HPOME	8-HOME  10-HOME	1-Octanol, 2-Undecenal
18:2 <sup>Δ9Z,12Z</sup>	8-HPODE  10-HPODE	8-HODE,  10-HODE, 12,13-Ep-10-HOME, 10-ODA, 10-KODE,	1-Octen-3-ol, 2-Octen-1-ol, 2-Octenal, 3-Octanon
18:3 <sup>Δ9Z,12Z,15Z</sup>	8-HPOTE  10-HPOTE	8-HOTE,  10-HOTE,  2E-Decendisäure	Octadien-Isomere

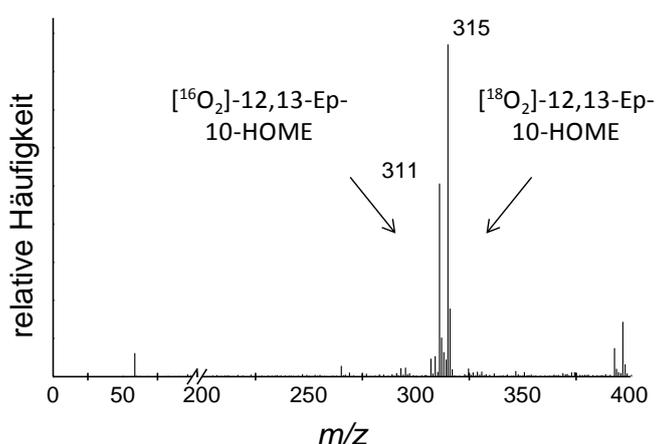
### 3.3.5 Untersuchungen der EAS-Aktivität

Wie 3.3.4 beschrieben, wurden bei der Reaktion von PpoC mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> kleinste Mengen an 12,13-Ep-10-HOME gebildet (3,2 %). Ähnliche Mengen wurden auch für die Reaktion von PpoA mit 8R-HPODE und 10-HPODE beschrieben (siehe 3.2.5.3). Außerdem zeigten Garscha und Oliw für die homologe 10R-Dioxygenase aus *A. fumigatus*, dass dieses Produkt von 10-HPODE ausgehend gebildet wird (Garscha und Oliw, 2009). Um zu untersuchen, ob die Bildung dieses Epoxyalkohols tatsächlich über ein intermediär gebildetes 10-Hydroperoxy-Fettsäurederivat verläuft, wurden zwei Versuchsansätze gewählt, die bereits in 3.2.6 für die Bildung des 5,8-Dihydroxy-Derivats dargestellt wurden: Zunächst wurde die Reaktion von Zellextrakt PpoC-exprimierender Zellen mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> unter einer Atmosphäre durchgeführt, die mit <sup>18</sup>O<sub>2</sub> versetzt war und die gebildeten Produkte wurden mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> (siehe 2.3.13.2) analysiert. Weiterhin wurde isoliertes 10-HPODE mit

Zellextrakt PpoC-exprimierender Zellen versetzt und die Produktbildung analysiert. Analog wurde das selbe Experiment mit isolierten 8R-HPODE durchgeführt, um die Bildung von 12,13-Ep-8-HOME zu untersuchen.

### 3.3.5.1 Analyse der Epoxyalkoholbildung unter $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre

Um den Ursprung der beiden Sauerstoffatome in den Epoxyalkohol-Derivaten zu untersuchen, wurde die Inkubation von PpoC mit 18:2 $^{\Delta 9Z,12Z}$  unter einer Atmosphäre durchgeführt, die mit  $^{18}\text{O}_2$  angereichert war. Hierzu wurden 800  $\mu\text{L}$  Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 8,0) mit 0,1 mM 18:2 $^{\Delta 9Z,12Z}$  versetzt, entgast (Ultraschallbad für 15 min) und mit  $^{18}\text{O}_2$  wie in 2.3.13.2 beschrieben auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von 200  $\mu\text{L}$  Zellextrakt PpoC-exprimierender Zellen gestartet. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 30 min; zwischenzeitlich wurde die Lösung wiederholt mit  $^{18}\text{O}_2$  versetzt. Nach der Extraktion mit Diethylether erfolgte die Analyse mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> (siehe 2.3.14.5). In Abb. 34 ist das erhaltene Esi-MS-Spektrum des 12,13-Ep-10-HOME-Derivates abgebildet. Es zeigt zwei distinkte Signale bei  $m/z$  311 und  $m/z$  315. Ein  $m/z$ -Quotient von 311 entspricht der molekularen Masse von 18:2 $^{\Delta 9Z,12Z}$  zuzüglich zweier  $^{16}\text{O}$ -Atome und abzüglich eines Protons ( $M^- + 2 \text{ }^{16}\text{O}$ ). Analog entspricht ein  $m/z$ -Quotient von 315 der molekularen Masse von 18:2 $^{\Delta 9Z,12Z}$  zuzüglich zweier  $^{18}\text{O}$ -Atome und abzüglich eines Protons ( $M^- + 2 \text{ }^{18}\text{O}$ ). Da kein Signal mit  $m/z$  313 detektiert werden konnte, zeigen diese Daten, dass die Epoxy- und die Hydroxy-Gruppe des 12,13-Ep-10-HOME-Derivats entweder  $^{16}\text{O}$  oder  $^{18}\text{O}$  enthalten. Molekulare Spezies, die beide Isotope tragen, konnten nicht nachgewiesen werden. Damit wird deutlich, dass die Sauerstoffatome der Hydroxy- und Epoxy-Gruppe vom gleichen Substratmolekül und damit vom molekularen Sauerstoff resultieren.

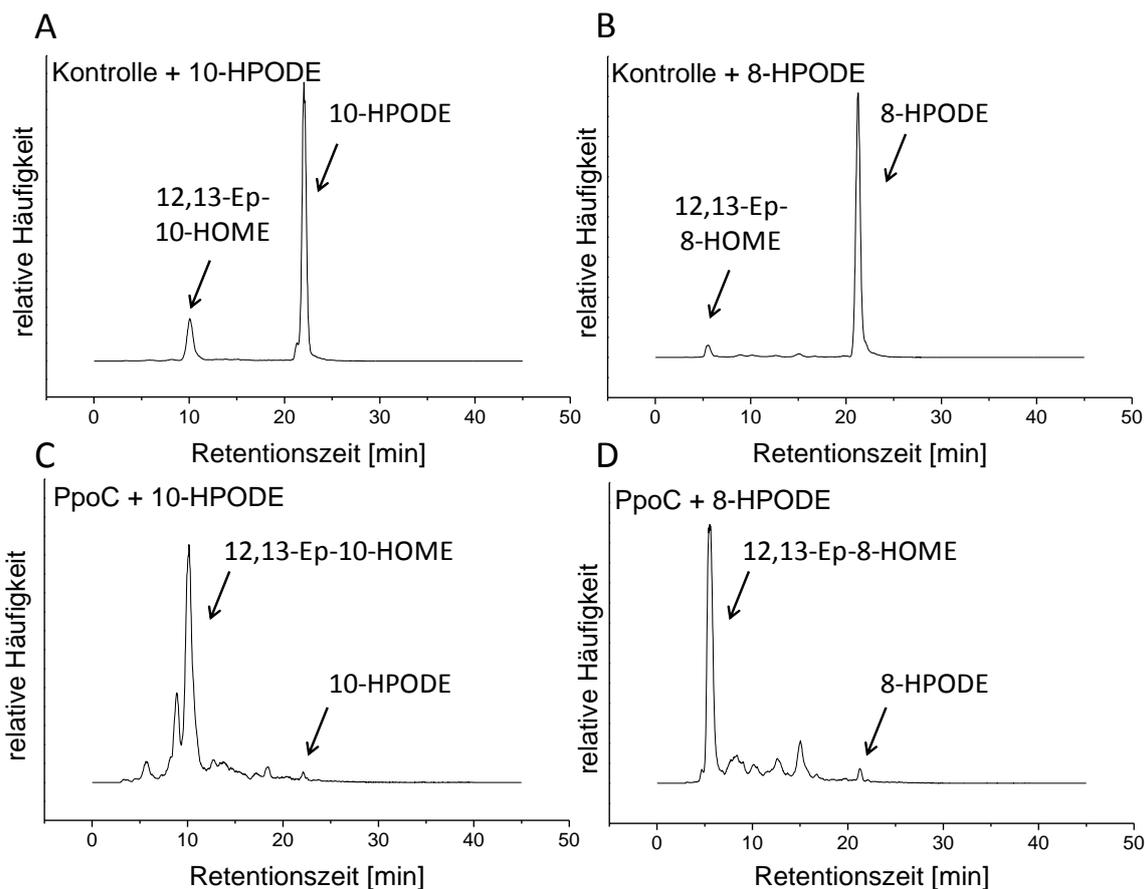


**Abb.34. Massenspektrometrische Analyse des unter  $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre durch 18:2 $^{\Delta 9Z,12Z}$  und PpoC gebildeten Epoxyalkohols.** Esi-MS-Spektrum von 12,13-Ep-10-HOME, das nach der Inkubation von Zellextrakt PpoC-exprimierender Zellen mit 0,1 mM 18:2 $^{\Delta 9Z,12Z}$  unter  $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre, anschließender Extraktion mit Diethylether (siehe 2.3.13.2) und der die Analyse mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> (siehe 2.3.14.5) erhalten wurde. Es handelt sich um ein repräsentatives Ergebnis von zwei Messungen.

### 3.3.5.2 Analyse der EAS-Aktivität

8*R*-HPODE und 10-HPODE wurde durch Inkubationen von PpoA\_H1004A bzw. PpoC mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> gebildet (siehe 2.3.13.1) und nach der Extraktion über RP-HPLC isoliert (siehe 2.3.14.1). Für die Reaktion wurden 500 μM des jeweiligen Hydroperoxy-Derivats mit 200 μL Zellextrakt PpoC-exprimierender Zellen (in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.14.1) Anschließend wurden die gebildeten Produkte mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> analysiert (siehe 2.3.14.5). Parallel wurden die Inkubationen mit Zellextrakten durchgeführt, die den leeren Vektor trugen und unter identischen Bedingungen kultiviert worden waren. In Abb. 35 sind die auf *m/z* 311 isolierten Ionenchromatogramme dargestellt. Wie zu erkennen ist, konnten nach der Inkubation von 10-HPODE mit Zellextrakt PpoC-exprimierender Zellen zwei deutliche Signale bei einer Retentionszeit von 8,8 min und 10,1 min detektiert werden. Die beiden entsprechenden Tandem-MS-Spektren zeigten ein identisches Fragmentationmuster, das charakteristisch für 12,13-Ep-10-HOME ist und bereits in Abb. 33 gezeigt wurde. Es kann angenommen werden, dass es sich hierbei um Stereoisomere handelt. Nach der Inkubation von 8*R*-HPODE mit Zellextrakt PpoC-exprimierender Zellen konnte ein starkes Signal detektiert werden, dessen Tandem-MS-Spektrum charakteristisch für 12,13-Ep-8-HOME ist und bereits in Abb. 18 dargestellt wurde.

Es sollte hier angemerkt werden, dass kleine Mengen der jeweiligen Epoxyalkohole auch in den Kontrollexperimenten nachgewiesen werden konnten (vgl. Abb. 35A & 35B). Da die Mengen allerdings wesentlich kleiner waren, als bei den Inkubationen mit PpoC, kann davon ausgegangen werden, dass ein Großteil der gebildeten Produkte durch eine enzymatische Reaktion von PpoC gebildet wurde.



**Abb.35. RP-HPLC/MS<sup>2</sup>-Analyse der Inkubationen von Zellextrakt PpoC-exprimierender Zellen mit 10-HPODE bzw. 8R-HPODE.** Für die Analyse wurden 200  $\mu$ L Zellextrakt PpoC-exprimierender Zellen (in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0) mit 500  $\mu$ M 8R-HPODE bzw. 10-HPODE inkubiert und anschließend mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.13.1). Parallel erfolgte die Inkubation mit 200  $\mu$ L Zellextrakt von *E. coli*-Zellen, die den leeren Vektor trugen und unter identischen Bedingungen kultiviert worden waren. Die Analyse mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> erfolgte wie in 2.3.14.5 beschrieben. A-B. Auf  $m/z$  311 extrahiertes Ionenchromatogramm der Inkubation von 10-HPODE (A) bzw. 8R-HPODE (B) mit Zellextrakt von *E. coli*-Zellen, die den leeren Vektor trugen (Kontrollexperiment). C-D. Auf  $m/z$  311 extrahiertes Ionenchromatogramm der Inkubation von 10-HPODE (C) bzw. 8R-HPODE (D) mit Zellextrakt PpoC-exprimierender Zellen. H(P)ODE, Hydro(pero)xyoctadecadiensäure; 12,13-Ep-8/10-HOME, 12,13-Epoxy-8/10-hydroxyoctadecensäure. Die Ergebnisse sind repräsentativ für ein bis zwei verschiedene Messungen.

### 3.3.6 Abfangen kohlenstoffzentrierter Fettsäure-Radikale mit Hilfe von stabilen Nitroxyl-Radikalen

Es wurde in vorangegangenen Arbeiten von Garscha und Oliw gezeigt, dass die Bildung von 10-HPODE über eine Abspaltung des proS-Wasserstoffatoms am C-8 des Fettsäurerückgrats und eine anschließende Isomerisierung der Doppelbindung vom C-8 zum C-9 erfolgt, bei der das zunächst am C-8 gebildete Radikal zum C-10 wandert. Dieses wird anschließend antarafacial vom molekularen Sauerstoff angegriffen und 10-HPODE wird gebildet (Garscha *et al.*, 2007). Um die Existenz dieser

kohlenstoffzentrierten Radikale zu überprüfen, wurde die Methode zum Abfangen kohlenstoffzentrierter Fettsäureradikale nach Koshiishi und Mitarbeitern benutzt (Koshiishi *et al.*, 2006, Koshiishi *et al.*, 2005, Takajo *et al.*, 2007), die bereits für das PpoA/18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup>-System detailliert dargestellt wurde (vgl. 3.2.6.4). Das Experiment für das PpoC/18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup>-System erfolgte zusammen mit Stefan Schneider analog wie in 2.3.14.6 beschrieben mit 125 nM gereinigtem PpoC. Das erhaltene RP-HPLC/MS-Chromatogramm entspricht im Wesentlichen dem für PpoA erhaltenen (siehe Abb. 19) und ist in der Diplomarbeit dargestellt (Schneider, Diplom 2009). Es konnten ebenfalls zwei distinkte Signale bei Retentionszeiten von 28,8 min und 30,8 min erhalten werden, die auf die Bildung von C-8- bzw. C-10-CmΔP-Fettsäure -Addukte hindeuten.

### 3.3.7 Kinetische Analysen

Die Analysen der initialen Geschwindigkeiten des Sauerstoffverbrauchs für die Reaktion von PpoC mit Fettsäuren erfolgten in Analogie zu den bereits für PpoA beschriebenen Messungen mit Hilfe der Sauerstoffelektrode (siehe 2.3.15.2). Die Messungen wurden zusammen mit Stefan Schneider im Rahmen seiner Diplomarbeit durchgeführt und sind dort dargestellt (Schneider, Diplom 2009). Da gereinigtes PpoC sehr instabil war, mussten die Messungen an der Sauerstoffelektrode mit Zellextrakt PpoC-exprimierender Zellen erfolgen. Die Analyse des pH-Optimums ergab, dass das pH-Optimum von PpoC im leicht alkalischen Bereich bei einem pH-Wert von 8,0 liegt.

Da die verwendete Proteinkonzentration für die kinetische Analyse unbekannt war, konnten lediglich die  $K_M$ -Konstanten für verschiedene Fettsäuren ermittelt werden. Diese werden in der folgenden Tabelle kurz zusammengefasst dargestellt und zeigen, dass 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> das präferierte Substrat ist.

**Tab.7: Kinetische Parameter für die Reaktion von PpoC mit verschiedenen Fettsäuren.** Die kinetische Analyse wurde mit Hilfe der Sauerstoffelektrode durchgeführt (siehe 2.3.15.2). Die initialen Geschwindigkeiten des Sauerstoffverbrauchs wurden bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen. Die  $K_M$ -Werte wurden über eine Regression der Michaelis-Menten Gleichung mit Hilfe der Software Origin 6.0 erhalten. Da gereinigtes PpoC instabil war, wurden die Messungen mit Zellextrakt PpoC-exprimierender Zellen durchgeführt. Die Messungen erfolgten bei Raumtemperatur in Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 8,0). Um die Bildung von Mizellen zu verhindern, wurden die Natriumsalze der jeweiligen Fettsäuren verwendet (siehe 2.3.15.1). Die Mittelwerte und Standardabweichungen ergeben sich aus drei Experimenten.

Substrate	$K_M$ -Werte [ $\mu$ M]
18:1 <sup>Δ9Z</sup>	13,1 ± 1,7
18:2 <sup>Δ9Z,12Z</sup>	3,6 ± 0,97
18:3 <sup>Δ9Z,12Z,15Z</sup>	7,9 ± 1,6

### 3.3.8 Analyse der Peroxidase-Aktivität

Wie in Abb. 32 und Tab. 5 gezeigt wurden bei der Reaktion von PpoC mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> geringe Mengen von 10-HODE als Nebenprodukt nachgewiesen. Um zu untersuchen, ob diese Reduktion von 10-HPODE zu 10-HODE durch PpoC enzymatisch katalysiert werden kann, wurde die kolorimetrische Methode von Kulmacz verwendet, bei der TMPD als Kosubstrat verwendet wird und die auch schon für PpoA in 3.2.8 dargestellt wurde. Die Untersuchung wurde zusammen mit Stefan Schneider durchgeführt (siehe 2.3.13.4). Für die Analyse wurden 125 nM gereinigtes PpoC verwendet. Der charakteristische Absorptionsanstieg wurde über 5 min beobachtet und ist in der Diplomarbeit in Abhängigkeit der Zeit dargestellt und beweist, dass PpoC wie auch PpoA eine Peroxidase-Aktivität besitzt (Schneider, Diplom 2009).

### 3.3.9 Mutagenesestudien an PpoC

Wie in Abb. 9 dargestellt und in 3.1 beschrieben zeigen Aminosäuresequenzvergleiche der N-terminalen Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne und der C-terminalen Cytochrom-P450-Domäne, dass in beiden Domänen verschiedene Aminosäurereste konserviert sind. Um zu untersuchen welche Reste für die Aktivität von PpoC essentiell sind, wurden gerichtete Punktmutagenesestudien durchgeführt. Die Plasmide mit den ausgetauschten Nukleotiden wurden wie in 2.3.4.2 beschrieben generiert. Die Expression erfolgt wie in 2.3.8 für das native PpoC beschrieben. Teile der Mutagenese Studie wurden zusammen mit Stefan Schneider durchgeführt (Schneider, Diplom 2009).

#### 3.3.9.1 Mutagenese des katalytischen Tyrosins

Eine der konservierten Aminosäuren in der Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne von PpoC ist Tyr-427; dieses Tyrosin ist in *A. nidulans* PpoA (Tyr-374), *G. graminis* 7,8-LDS (Tyr-376), *O. aries* PGHS-1 (Tyr-385) und *O. aries* PGHS-2 (Tyr-370) konserviert. Wie bereits beschrieben, führte der Austausch von Tyr-374 zu Phe in PpoA zu einem Verlust der Dioxygenase-Aktivität (siehe 3.2.9.1.1). Der Austausch von Tyr-427 zu Phe in PpoC führte ebenfalls zu einem Enzym, das mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> keine Aktivität an der Sauerstoffelektrode zeigte. Auch bei der Analyse mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> (siehe 2.3.14.5.) konnte weder die Bildung von 10-H(P)ODE noch 8R-H(P)ODE nachgewiesen werden, obwohl die Analyse SDS-PAGE eindeutig die Expression von PpoC\_Y427F zeigte (Schneider, Diplom 2009).

### 3.3.9.2 Mutagenese der mutmaßlichen Cytochrom-P450-Domäne von PpoC

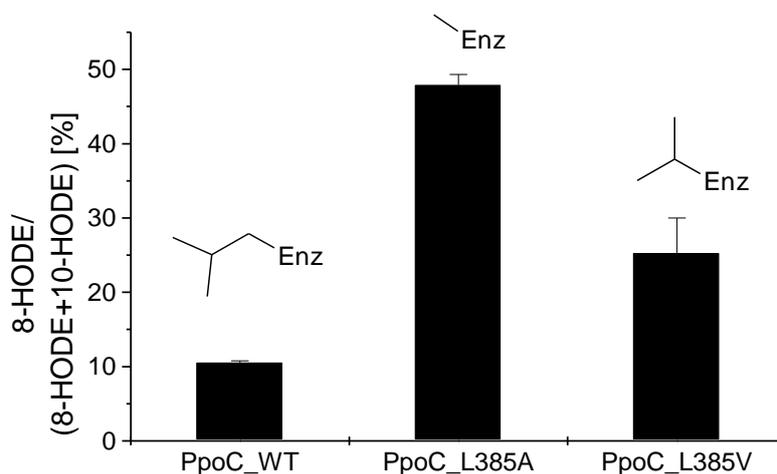
PpoC besitzt in der mutmaßlichen Cytochrom-P450-Domäne anstelle des konservierten Cysteins, das bekannt ist als fünfter Häm-Eisen-Ligand in Cytochrom-P450-Enzymen, ein Glycin (Gly-1039). Der Austausch dieses Cysteins durch Alanin in PpoA führte zu einem Enzym (PpoA\_C1006A), das Dioxygenase- aber keine Isomerase-Aktivität besaß (vgl. 3.2.9.1.1). Es kann angenommen werden, dass diese veränderte Aktivität durch eine Zerstörung des Cytochrom-P450-Häm-Bindungssignatur-Motivs hervorgerufen wurde. Um analog hierzu das anscheinend unvollständige Häm-Bindungssignatur-Motiv der PpoC zu rekonstruieren und so ein Enzym mit Isomerase-Aktivität zu generieren, wurde Gly-1039 durch Cystein ersetzt. Wurde die so erhaltene PpoC-Variante (PpoC\_G1039C) mit 18:2<sup>Δ<sup>9Z</sup>,12Z</sup> inkubiert (siehe 2.3.13.1), so konnten mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> (siehe 2.3.14.5) keine Isomeraseprodukte, d.h. keine Dihydroxy-Derivate, nachgewiesen werden (Schneider, Diplom 2009). Auch nach der Inkubation von PpoC\_G1039C mit isolierten 8R-HPODE konnte mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> keine Bildung von 5,8-DiHODE nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

### 3.3.9.3 Mutagenese von regiospezifitätsrelevanten Aminosäuren

PpoC besitzt in der Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne an Position 385 der Aminosäuresequenz ein Leucin, während sich bei PpoA, *G. graminis* 7,8-LDS, *O. aries* PGHS-1 und *O. aries* PGHS-2 an dieser Position ein konserviertes Valin befindet (siehe Abb. 9). Der Austausch von Val-328 in PpoA gegen Alanin führte zu einem Enzym (PpoA\_V328A), das deutlich mehr 10-HODE und weniger 8R-HODE bildete als das native Enzym (PpoA\_WT) und somit die Position des Sauerstoffeinbaus vom C-8 zum C-10 verschoben wurde (vgl. 3.2.9.2). Der Austausch hingegen von Val-328 durch Leucin zeigte, dass der Sauerstoffeinbau in dieser PpoA-Variante bevorzugt am C-8 stattfand (vgl. 3.2.9.2).

Um die Rolle dieses Leucins für die Kontrolle der Oxygenierungsposition im Fall von PpoC zu untersuchen, wurde es gegen Alanin (L385A) bzw. Valin (L385V) ausgetauscht (siehe 2.3.4.2). Die so erhaltenen Enzyme werden im Folgenden als PpoC\_L385A bzw. PpoC\_L385V bezeichnet, während die Bezeichnung für das native PpoC durch PpoC\_WT abgekürzt wird. Die Generierung dieser PpoC-Varianten erfolgte in Zusammenarbeit mit Stefan Schneider. Die Expression der PpoC-Varianten erfolgte unter den gleichen Kultivierungsbedingungen wie für das native PpoC (siehe 2.3.8). Für die Analyse wurde Zellextrakt PpoC\_WT-, PpoC\_L385A- bzw. PpoC\_L385V-exprimierender Zellen mit 0,1 mM 18:2<sup>Δ<sup>9Z</sup>,12Z</sup> bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert und anschließend mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.13.1). Die Analyse erfolgte mit RP-HPLC/MS<sup>2</sup> wie in 2.3.14.5 beschrieben. Die relativen Mengen der beiden Hydroxy-Produkte, 8R-HODE und 10-HODE, wurden durch Integration der korrespondierenden Signale bei *m/z* 295 mit Hilfe der Xcalibur-Software ermittelt. Das Ergebnis ist als Säulendiagramm in Abb. 36 visualisiert.

Die Inkubation von PpoC\_WT mit  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  zeigte, dass 10,5 % der gebildeten Hydroxy-Produkte 8R-HODE waren, während die übrigen 89,5 % aus 10-HODE bestanden. Der Austausch von Leucin-385 gegen die nächst kleinere Aminosäure Valin führte zu einer Steigerung der Bildung von 8R-HODE (25,3 %) und einem Rückgang an 10-HODE (74,7 %). Wurde Leucin-385 durch die noch kleinere Aminosäure Alanin ersetzt, so stieg der relative Gehalt an gebildeten 8R-HODE auf 47,9 %, während 10-HODE mit lediglich 52,1 % gebildet wurde.



**Abb.36. Analyse der durch PpoC\_WT, PpoC\_L385A bzw. PpoC\_L385V gebildeten relativen Mengen von 8R-HODE.** Für die Messung wurden Zellextrakt PpoC\_WT-, PpoC\_L385A- bzw. PpoA\_C385V-exprimierender Zellen für 30 min bei Raumtemperatur mit  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  schüttelnd inkubiert, mit Diethylether extrahiert (siehe 2.3.13.1) und anschließend mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> analysiert (siehe 2.3.14.5). Die relativen Mengen an 8R-HODE und 10-HODE wurden durch Integration der korrespondierenden Signale bei  $m/z$  295 mit Hilfe der Xcalibur-Software bestimmt. Über jeder Säule ist der Aminosäurerest an Position 385 der jeweiligen PpoC-Variante dargestellt. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden anhand von drei Experimenten ermittelt.

## 4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war eine detaillierte Charakterisierung von Ppo-Enzymen, die eine regulatorische Funktion für den Entwicklungszyklus und die Mycotoxinproduktion in *A. nidulans* besitzen. Bioinformatische Analysen sagten für Ppo-Enzyme die Existenz zweier Proteindomänen vorher: Der N-terminale Sequenzabschnitt weist eine hohe Ähnlichkeit zu tierischen Peroxidasen auf, während der C-terminale Sequenzabschnitt den Cytochrom-P450-Enzymen ähnelt.

Eine nähere Analyse konservierter Aminosäurereste zeigte, dass die Aminosäuresequenzen von PpoA und PpoC in der N-terminalen tierischen Peroxidase-Domäne hohe Ähnlichkeiten zu den Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domänen der 7,8-LDS aus *G. graminis* und der beiden PGHS-Isoformen aus *O. aries* aufweisen (siehe Abb. 9A). Aminosäuren, die in diesen Enzymen als essentiell identifiziert wurden, finden sich sowohl in der PpoA als auch in der PpoC-Sequenz. Der C-terminale Abschnitt der PpoA Aminosäuresequenz weist zudem Sequenzmotive auf, die typisch für Cytochrom-P450-Enzyme sind; insbesondere erscheint das Häm-Bindungssignatur-Motiv in der Cytochrom-P450-Domäne als vollkommen konserviert. Die Aminosäuresequenz der PpoC zeigt hingegen, dass zwar einige für Cytochrom-P450-Enzyme typische Sequenzmotive konserviert sind, doch ist das Häm-Bindungssignatur-Motiv nicht konserviert (siehe Abb. 9B). Insbesondere fehlt hier der fünfte Häm-Ligand, so dass angenommen werden kann, dass diese Domäne keine katalytische Funktion übernimmt.

Auf der Basis solcher bioinformatischer Analysen und spektroskopischer Untersuchungen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PpoA zwei verschiedene Häm-bindende Domänen besitzt: im N-terminalen Sequenzabschnitt ist die Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne lokalisiert, während sich die Cytochrom-P450-Domäne im C-terminalen Sequenzabschnitt befindet. Für PpoC konnte nur die Existenz einer N-terminalen Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne nachgewiesen werden.

Es sind bereits verschiedene Enzyme bekannt, die je eine dieser Domänen für die Oxidation von Substraten verwenden, aber bisher gibt es keine Studien über Enzyme, die beide Domänen besitzen. So fungieren Enzyme mit einer Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne in den meisten Fällen als Dioxygenasen, wie z.B. die 7,8-LDS, PGHS und  $\alpha$ -DOX (Hamberg *et al.*, 1994, Su *et al.*, 1998, Rouzer und Marnett, 2003, Sanz *et al.*, 1998, Koeduka *et al.*, 2002). Dementgegen katalysieren Cytochrom-P450-Enzym meistens Monooxygenase-Reaktionen (Meunier *et al.*, 2004); es sind aber auch einige Cytochrom-P450-Enzyme bekannt, die eine Isomerisierung von Hydroperoxy-Fettsäurederivaten katalysieren, wie z.B. die CYP74-Enzyme (Stumpe und Feussner, 2006).

Für die detaillierte biochemische Untersuchung von PpoA und PpoC wurde zunächst ein heterologes Expressionssystem in *E. coli* und ein Reinigungsprotokoll beider Enzyme etabliert. Während PpoA mit hohen Proteinausbeuten isoliert werden konnte, zeigte sich für PpoC, dass dieses Enzym in

isolierter Form instabil war und in einigen Minuten bzw. wenigen Stunden die katalytische Aktivität verlor.

In der vorliegenden Arbeit wurden PpoA und PpoC als homotetramere Häm-Proteine identifiziert, die die Oxidation von Fettsäuren zu Fettsäurehydroperoxiden katalysieren. Im Falle von PpoA konnte zudem gezeigt werden, dass das intermediär gebildete Hydroperoxy-Derivat in einem weiteren Reaktionsschritt zu einem Dihydroxy-Derivat isomerisiert wird.

In der folgenden Diskussion werden zunächst die biochemischen Eigenschaften von PpoA im Kontext mit bereits bekannten Fettsäure-Häm-Dioxygenasen/Peroxidasen und Cytochrom-P450-Enzymen diskutiert werden. Hierbei liegt ein besonderer Schwerpunkt auf den besonderen Eigenschaften von PpoA, die sich aus der Existenz zweier verschiedener Häm-Domänen ergeben. In einem zweiten Teil der Diskussion werden dann gemeinsame Eigenschaften von PpoA und PpoC diskutiert und verglichen.

#### **4.1 Biochemische Eigenschaften von PpoA**

Für PpoA konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym in einem ersten Reaktionsschritt  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  zu  $8R$ -HPODE oxidiert und anschließend dieses intermediär gebildete Zwischenprodukt weiter zu  $5,8$ -DiHODE isomerisiert. Neben diesen beiden Produkten wurden außerdem Spuren von  $8R$ -HODE,  $10$ -HODE,  $8$ -KODE und  $12,13$ -Ep- $8$ -HOME nachgewiesen (siehe Abb. 15). Ähnliche Beobachtungen wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Oliw gemacht. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass während der Inkubation von  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  und *A. nidulans* Zellextrakt  $8R$ -HPODE und  $5S,8R$ -DiHODE gebildet wird. Eine Analyse, in der isotopenmarkierte Fettsäure verwendet wurden, zeigte zudem, dass der erste Reaktionsschritt über die Abspaltung des proS-Wasserstoffatoms und eine antarafaciale Sauerstoffefführung erfolgte. Der zweite Reaktionsschritt erfolgte über eine suprafaciale Wasserstoffabspaltung und Sauerstoffefführung (Garscha *et al.*, 2007), wie sie auch bei Hydroxylierungen aliphatischer Kohlenwasserstoff-Derivate durch Cytochrom-P450-Enzyme katalysiert wird (Schneider *et al.*, 2007). Es wurde postuliert, dass PpoA eine  $5,8$ -LDS ist, die in Analogie zu der bereits eingehend untersuchten  $7,8$ -LDS (vgl. 1.4.3) funktioniert (Garscha *et al.*, 2007). Die auffallendste Gemeinsamkeit zwischen PpoA und  $7,8$ -LDS ist der Reaktionsverlauf. So bilden beide Enzyme in einem ersten Reaktionsschritt ein Hydroperoxy-Fettsäurederivat, das im folgenden Reaktionsschritt zu einem Dihydroxy-Fettsäurederivat isomerisiert wird. PpoA bildet so ein  $5,8$ -Dihydroxy-Fettsäurederivat, während die  $7,8$ -LDS ein  $7,8$ -Dihydroxy-Fettsäurederivat formt (Hamberg *et al.*, 1994). Da durch ESR-Analysen die Bildung eines Protein-Radikals während der Reaktion der  $7,8$ -LDS und  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  nachgewiesen werden konnte, wurde angenommen, dass die Bildung von  $8R$ -HPODE über ein intermediär gebildetes kohlenstoffzentriertes Radikal am C-8 der

Fettsäure verläuft (Su *et al.*, 1998). Ein direkter Nachweis dieses Fettsäure-Radikals wurde von Oliw und Mitarbeitern allerdings nicht erbracht. Um die Bildung eines kohlenstoffzentrierten Radikals bei der Reaktion von PpoA mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> zu untersuchen, wurde die Methode von Koshiishi und Mitarbeitern zum Abfangen solcher Radikale benutzt, in der CmΔP als Radikalfänger verwendet wird (Koshiishi *et al.*, 2005, Koshiishi *et al.*, 2006, Takajo *et al.*, 2007). Die so abgefangenen Radikal-Fettsäure-Addukte, wurden als C-8-Radikal-Addukt und C-10-Radikal-Addukt identifiziert (siehe Abb. 19). Dieses Ergebnis zeigt somit, dass während der Reaktion von PpoA und einer Fettsäure am C-8 ein Radikal intermediär gebildet wird, welches delokalisiert ist und durch eine Verschiebung der Δ9-Doppelbindung in Richtung Δ8 zum C-10 gelangen kann. Die Bildung von zwei kohlenstoffzentrierten Radikalen an C-8 und C-10 stimmt mit den Beobachtungen überein, dass während der Reaktion sowohl 8-Hydro(pero)xy- wie auch 10-Hydro(pero)oxy-Derivate gebildet werden (siehe Abb. 15). Aminosäurereste, die die Oxidation am C-8 bzw. C-10 kontrollieren, werden in einem späteren Abschnitt 4.2 im Kontext der PpoC noch näher diskutiert.

Um einen tieferen Einblick in den Reaktionsmechanismus zu erhalten, wurden zunächst konservierte Aminosäuren in der Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne von PpoA ausgetauscht. Tyr-374 der PpoA Aminosäuresequenz ist in der PGHS (Tyr-385 in *O. aries* PGHS-1, Tyr-370 in *O. aries* PGHS-2), 7,8-LDS (Tyr-376 in *G. graminis* 7,8-LDS) und α-DOX (Tyr-380 in *Oryza sativa* α-DOX) konserviert (siehe Abb. 9). Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Austausch dieses Tyrosins in α-DOX, 7,8-LDS und PGHS zu einer Inhibierung der Dioxygenase-Reaktion führte (Koeduka *et al.*, 2002, Garscha und Oliw, 2008b, Thuresson *et al.*, 2001). Der Austausch von Tyr gegen Phe in PpoA (PpoA\_Y374F) führte ebenfalls zu einem Verlust der Dioxygenase-Aktivität. Es konnte keine Produktbildung beobachtet werden, wenn diese PpoA-Variante mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> inkubiert wurde (siehe Abb. 23). Wurde für die Inkubation anstatt 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> allerdings das Zwischenprodukt der Reaktion, 8*R*-HPODE, verwendet, so konnte die Isomerisierung zu 5,8-DiHODE beobachtet werden (siehe Abb. 24C). Auf der Grundlage dieser Beobachtung kann angenommen werden, dass die Dioxygenase-Reaktion und die 8-Hydroperoxid-Isomerase Reaktion in unterschiedlichen aktiven Zentren des Enzymes katalysiert werden. Während dies ebenfalls für die PGHS beobachtet wurde (Smith *et al.*, 2000, Rouzer und Marnett, 2003), ist es bislang unklar, ob die 7,8-LDS ebenfalls zwei unterschiedliche katalytische Zentren benutzt. So wurde z.B. für die 7,8-LDS eine enzymatische Inaktivierung beobachtet, wenn dieses Enzym mit Tetranitromethan, einem Reagenz, das Tyrosin in 3-Nitrotyrosin überführt, behandelt wurde (Su *et al.*, 1998). Aktuelle Mutagenese-Studien zeigten allerdings kürzlich, dass durch den Austausch von Tyr gegen Phe in der 7,8-LDS zwar die Dioxygenase- aber nicht die Isomerase-Aktivität inhibiert wird (Garscha und Oliw, 2008a, Garscha und Oliw, 2008b). Es kann angenommen werden, dass Tyr-374 in PpoA eine ähnliche Funktion besitzt wie in der 7,8-LDS, PGHS und α-DOX, nämlich die Bildung eines Radikals, das für die Abstraktion des Wasserstoffatoms am C-8 der Fettsäure verantwortlich ist. Diese Hypothese wird zudem durch

Ergebnisse unterstützt, bei denen die Bildung eines organischen Radikals mittels ESR nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 29). Zwar kann anhand der dargestellten ESR-Spektren das Radikal nicht eindeutig als Tyrosyl-Radikal identifiziert werden, aber die Beobachtung, dass die PpoA\_Y374F-Variante dieses Radikal nicht bilden kann, stellt ein Argument für die Bildung eines solchen Radikals dar. Zudem zeigen aktuelle hochauflösende ESR-Untersuchungen bei einer Frequenz von 285 GHz, dass das gebildete Radikal typische  $g$ -Faktoren für ein Tyrosyl-Radikal aufweist (persönliche Mitteilung, Dr. Alistair Fielding).

Um weiterhin die Bildung eines kohlenstoffzentrierten Radikals am C-8 des Fettsäurerückgrats zu untersuchen, wurde von André Nadler (Institut für organische und biomolekulare Chemie, Göttingen) ein 18:1<sup>Δ9Z</sup> Isomer synthetisiert, bei dem die beiden Wasserstoffatome am C-8 durch Deuteriumisotope (8-[D<sub>2</sub>]-18:1<sup>Δ9Z</sup>) ersetzt worden waren. Die Analyse mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> zeigte, dass während der Reaktion dieses modifizierten Substrats und PpoA zu 8-HPOME bzw. 5,8-DiHOME eines der beiden Deuteriumatome abgespalten wird (siehe Abb. 30). Interessanterweise konnte für die Wasserstoff- bzw. Deuteriumabstraktion ein hoher primärer *KIE* beobachtet werden (siehe 3.2.11). Dies deutet an, dass die initiale Wasserstoffabspaltung zumindest teilweise der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Reaktion ist. Ein ähnlicher Effekt wurde für die Reaktion der PGHS mit 13S-T-[3-<sup>14</sup>C]-8Z,11Z,14Z-eicosatriensäure beschrieben (Hamberg und Samuelsson, 1967). Der *KIE* für die Reaktion von PpoA mit 18:1<sup>Δ9Z</sup> bzw. 8-[D<sub>2</sub>]-18:1<sup>Δ9Z</sup> besaß einen Wert von  $k_H/k_D = 12,2$  und ist somit zu hoch, als dass er mit einem klassischen primären *KIE* erklärt werden könnte. Die Werte für klassische primäre *KIE* liegen normalerweise zwischen  $k_H/k_D = 2$  und  $k_H/k_D = 10$  (Laidler und Bunting, 1973, Kuby, 1990). Dies deutet auf eine multiplikative Erhöhung des *KIE* während der Gesamtreaktion hin und könnte wie folgt erklärt werden: Die Abspaltung des Deuteriums vom C-8 der Fettsäure durch Tyr-374 bedingt zunächst eine langsamere Bildung des kohlenstoffzentrierten Radikals; bei dieser Reaktion wird das abgespaltene Deuterium auf das katalytische Tyr-374 übertragen, an welchem für die folgenden Reaktionen wieder ein Radikal gebildet werden muss. Es ist somit denkbar, dass diese erneute Radikalbildung am Tyrosin durch die Abspaltung eines Deuteriums abermals eine verlangsamte Reaktionsgeschwindigkeit erfährt. Dies wiederum bedingt eine weitere Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit, wie sie für die Gesamtreaktion beobachtet werden kann. Eine weitere denkbare Erklärung für einen erhöhten Wert für den primären *KIE* wäre, dass es sich hier um einen quantenmechanischen Tunneleffekt handelt. Die Masse von Wasserstoff- bzw. Deuteriumatomen ist klein genug, so dass sie nicht notwendigerweise die Energiebarriere zur Bindungsspaltung überschreiten müssen. Stattdessen bleiben die Atomkerne unterhalb der Energiebarriere und tunneln durch diese an sich „verbotene Zone“ vom Edukt zum Produkt (Scheiner, 2000).

Zusätzlich zu der Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne weist PpoA eine Cytochrom-P450-Domäne auf, deren Existenz auf der Basis von Aminosäuresequenzvergleichen und spektroskopischen Untersuchungen nachgewiesen wurde. So zeigte der reduzierte Häm-CO-Komplex

die für Cytochrom-P450-Enzyme charakteristische Absorption bei 450 nm (siehe Abb. 11B). Weiterhin zeigten ESR-Spektren Signale für high-spin- ( $g = 6,0$ ) und low-spin-Häm-Eisen(III)-Komplexe ( $g = 2,44, 2,25$  und  $1,91$ ), die charakteristisch für Fettsäure-Häm-Dioxygenasen/Peroxidasen bzw. Cytochrom-P450-Enzyme sind (siehe Tab. 7).

**Tab.8: Vergleich der für PpoA ermittelten  $g$ -Faktoren mit denen anderer Enzyme.**

PpoA, Psi-Faktor-produzierende-Oxygenase A, PGHS, Prostaglandin-H<sub>2</sub>-Synthase, CcP, Cytochrom-c-Peroxidase, HRP, Meerrettich-Peroxidase (HRP engl. *Horseradish Peroxidase*), P450cam; Campher-5-Monooxygenase (cam engl. *camphor*), P450 BM-3, Fettsäure-Monooxygenase aus *Bacillus megaterium*, CYP74B, Alfalfa Hydroperoxid-Lyase

Enzym	$g$ -Faktor	$g$ -Faktor	Referenz
	(high-spin-Häm-Eisen(III)-Komplex)	(low-spin-Häm-Eisen(III)-Komplex)	
PpoA	6,0	2,44, 2,25, 1,91	Diese Arbeit
PGHS	6,0 (6,6 & 5,4)	2,98, 2,19	(Tsai <i>et al.</i> , 1993)
CcP	6,0	2,70, 2,20, 1,78	(Yonetani und Anni, 1987)
HRP	6,0	2,9, 2,1, 1,6	(Blumberg <i>et al.</i> , 1968)
P450cam	-	2,45, 2,26, 1,91	(Lipscomb, 1980)
P450 BM-3	-	2,41, 2,25, 1,92	(Miles <i>et al.</i> , 1992)
CYP74B	-	2,40 2,24, 1,92	(Noordermeer <i>et al.</i> , 2001)

Um zu untersuchen, welche Funktion die Cytochrom-P450-Domäne für die katalytische Aktivität von PpoA besitzt, wurden konservierte Aminosäurereste im Häm-Bindungssignatur-Motiv mutiert, die wahrscheinlich an der Bindung des Häm-Kofaktors beteiligt sind. Aminosäuresequenzvergleiche zeigten, dass sich His-1004 in der Nähe des essentiellen Cysteins (Cys-1006) befindet (siehe Abb. 9), von dem angenommen werden kann, dass es als der fünfte Häm-Eisen-Ligand fungiert (Auclair *et al.*, 2001). Um das Häm-Bindungssignatur-Motiv zu deformieren und so die Bindung des Häm-Kofaktors zu verhindern, wurde His-1004 gegen Ala (PpoA\_H1004A) ausgetauscht.

Diese PpoA-Variante zeigte eine intakte Dioxygenase-Aktivität und konnte  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  zu 8*R*-HPODE oxidieren. Allerdings konnte dieses Intermediat anschließend nicht zu dem Endprodukt 5,8-DiHODE isomerisiert werden (siehe Abb. 23D).

Die spektroskopische Analyse dieser PpoA-Variante mittels UV/vis-Spektroskopie zeigte, dass diese ein verringertes Verhältnis des  $A_{\text{Soret}}$ -Signals zu dem  $A_{280}$ -Signal aufweist (siehe Abb. 26). Es kann somit gefolgert werden, dass der Häm-Gehalt bei dieser PpoA-Variante um 30 % - 50 % im Vergleich zum nativen Enzym reduziert war. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Analyse mittels ESR-Spektroskopie. Die ESR-Spektren zeigten keine Signale für low-spin-Eisen(III)-Komplexe, während das Signal für den high-spin-Häm-Eisen(III)-Komplex den gleichen  $g$ -Faktor wie das native Enzym aufwies (siehe Abb. 27). Es kann angenommen werden, dass der Austausch des His-1004 durch Ala die Bindung des Häm-Kofaktors in der Cytochrom-P450-Domäne verhindert. Dies wiederum hat zur Folge, dass keine 8-Hydroperoxid-Isomerase-Reaktion mehr katalysiert wird.

Ein weiterer Beweis dafür, dass die Cytochrom-P450-Domäne für die Isomerisierung von 8*R*-HPODE zu 5,8-DiHODE verantwortlich ist, wurde durch den Austausch des essentiellen Cysteins (Cys-1006) durch Alanin erbracht. Diese PpoA-Variante zeigte ebenfalls keine 8-Hydroperoxid-Isomerase-Aktivität, während die Dioxygenase-Aktivität durch diesen Aminosäureaustausch unverändert blieb (siehe Abb. 23D). Es ist bereits mehrfach berichtet worden, dass der Austausch des essentiellen Cysteins, welches als fünfter Häm-Eisen-Ligand in allen Cytochrom-P450-Enzymen fungiert, durch jede andere kanonische Aminosäure zu einer enzymatischen Inaktivierung des Proteins führt (Auclair *et al.*, 2001, Yoshioka *et al.*, 2001).

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse kann gefolgert werden, dass PpoA zwei verschiedene Häm-bindende Domänen besitzt, die beide unterschiedliche katalytische Funktionen besitzen: Während die N-terminale Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne die Oxidation von 18:2<sup>Δ<sup>9</sup>Z,12Z</sup> zu 8*R*-HPODE katalysiert, ist die C-terminale Cytochrom-P450-Domäne für die Isomerisierung des intermediär gebildeten Hydroperoxids verantwortlich.

Interessanterweise scheint die Cytochrom-P450-Domäne funktionelle und strukturelle Gemeinsamkeiten mit anderen Cytochrom-P450-Enzymen, wie z.B. der PGIS oder AOS, zu besitzen: Klassische Cytochrom-P450-Enzyme aktivieren molekularen Sauerstoff über externe Elektronen-Donoren, wie bspw. NAD(P)H abhängige Reduktasen und katalysieren zumeist Hydroxylierungen oder Epoxidierungen (Meunier *et al.*, 2004, Coon, 2005). Im Gegensatz zu diesen Enzymen katalysieren die AOS, PGIS und TXAS Isomerisierungen von Hydroperoxy- bzw. Endoperoxy-Derivaten und benötigen für diese Reaktion weder externe Elektronen-Donoren noch molekularen Sauerstoff (Stumpe und Feussner, 2006, Lee *et al.*, 2008, Song und Brash, 1991, Yeh *et al.*, 2005). In Analogie hierzu katalysiert die Cytochrom-P450-Domäne von PpoA ebenfalls eine Isomerisierung eines Hydroperoxy-Derivats, nämlich die Isomerisierung von 8*R*-HPODE zu 5,8-DiHODE. Diese Reaktion ist ebenfalls unabhängig von molekularem Sauerstoff oder externen Elektronen-Donoren. Zudem zeigte PpoA nur ein schwaches und transient gebildetes Signal bei 450 nm, wenn es mit Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> und CO inkubiert wurde (siehe Abb. 11B). Die Bildung eines reduzierten Häm-CO-Komplexes mit einem Absorptionsmaximum bei 450 nm stellt einen prinzipiellen Nachweis für eine Cytochrom-P450-Domäne dar (Omura und Sato, 1964b, Omura und Sato, 1964a). Allerdings deutet

ein nur schwaches Absorptionsmaximum bei 450 nm auf eine unvollständige Reaktion hin, wie es auch für die AOS beschrieben wurde (Song und Brash, 1991, Lau *et al.*, 1993). Es wird angenommen, dass die schwache Bindung des CO an das Häm-Eisen durch eine strukturelle Konformation im aktiven Zentrum hervorgerufen wird, die die axiale Bindung verhindert (Song und Brash, 1991, Lee *et al.*, 2008).

Der transient gebildet Häm-CO-Komplex von PpoA erschien zudem instabil zu sein und zerfiel in kürzester Zeit zu einer Spezies, die als Cytochrom-P420 bezeichnet wird und ein typisches Absorptionsmaximum bei 420 nm besitzt (Omura und Sato, 1964b, Panicco *et al.*, 2008). Diese Beobachtung wurde ebenfalls für P450<sub>bisd</sub> aus *Sphingomonas sp.* (Sasaki *et al.*, 2005) und die PGIS aus *Homo sapiens* (Yeh *et al.*, 2005) gemacht. Es wird angenommen, dass diese Spezies durch eine Schwächung oder Deformation der Eisen-Thiolat-Bindung gebildet wird. Im Falle der PGIS wird vermutet, dass diese Deformation durch ein geringes Volumen des aktiven Zentrums bedingt wird (Chiang *et al.*, 2006).

Interessanterweise zeigten Sequenzvergleiche der PpoA-Aminosäuresequenz mit der Aminosäuresequenz der 7,8-LDS zunächst keine Homologien in der Region der Cytochrom-P450-Domäne, so dass bislang angenommen werden konnte, dass in beiden Enzymen unterschiedliche Mechanismen für die Isomerisierung verwendet werden. Kürzlich wurde die Aminosäuresequenz der 7,8-LDS in der NCBI-Datenbank aktualisiert. Es zeigte sich, dass bei der vorherigen Sequenz ca. 140 Aminosäuren fehlten. Obwohl bioinformatische Analysen für die aktuelle Sequenz keine Cytochrom-P450-Domäne vorhersagten, zeigten Aminosäuresequenzvergleiche, dass die Sequenz der 7,8-LDS einige für Cytochrom-P450-Enzyme typische Motive aufweist. So ist unter anderem das bereits mehrfach erwähnte Häm-Bindungssignatur-Motiv fast vollständig konserviert. Die Existenz einer Cytochrom-P450-Domäne in der 7,8-LDS wurde bisher noch nicht nachgewiesen. Es wurde beschrieben, dass der reduzierte Häm-CO-Komplex im Falle der 7,8-LDS kein charakteristisches Absorptionsmaximum bei 450 nm zeigte (Su und Oliw, 1996). Vor dem Hintergrund des bei PpoA instabilen und nur transient gebildeten Häm-CO-Komplexes könnte angenommen werden, dass bei diesem Enzym ein ähnliches Phänomen vorliegt und der Häm-CO-Komplex zu kurzlebig für die bisherigen UV/vis Messung war. ESR-Spektren der 7,8-LDS unterstützen die Annahme, dass 7,8-LDS ebenfalls eine Cytochrom-P450-Domäne besitzt. So wurden ähnliche *g*-Faktoren für high-spin-Häm-Eisen(III) und low-spin-Häm-Eisen(III) berichtet (Su *et al.*, 1998), wie sie in dieser Arbeit für PpoA bestimmt wurden.

Für die PGHS ist bekannt, dass die Cyclooxygenase-Reaktion und die Peroxidase-Reaktion in unterschiedlichen aktiven Zentren innerhalb der gleichen Protein-Domäne katalysiert werden (Smith *et al.*, 2000, Rouzer und Marnett, 2003). Während die Peroxidase-Aktivität unabhängig von der Cyclooxygenase-Aktivität funktionieren kann (Mizuno *et al.*, 1982, Koshkin und Dunford, 1999), benötigt die Cyclooxygenase eine initiale Aktivierung der Häm-Gruppe durch Hydroperoxy-Derivate (Smith und Lands, 1972, Landino *et al.*, 1997). Im Falle von PpoA konnte gezeigt werden, dass beide

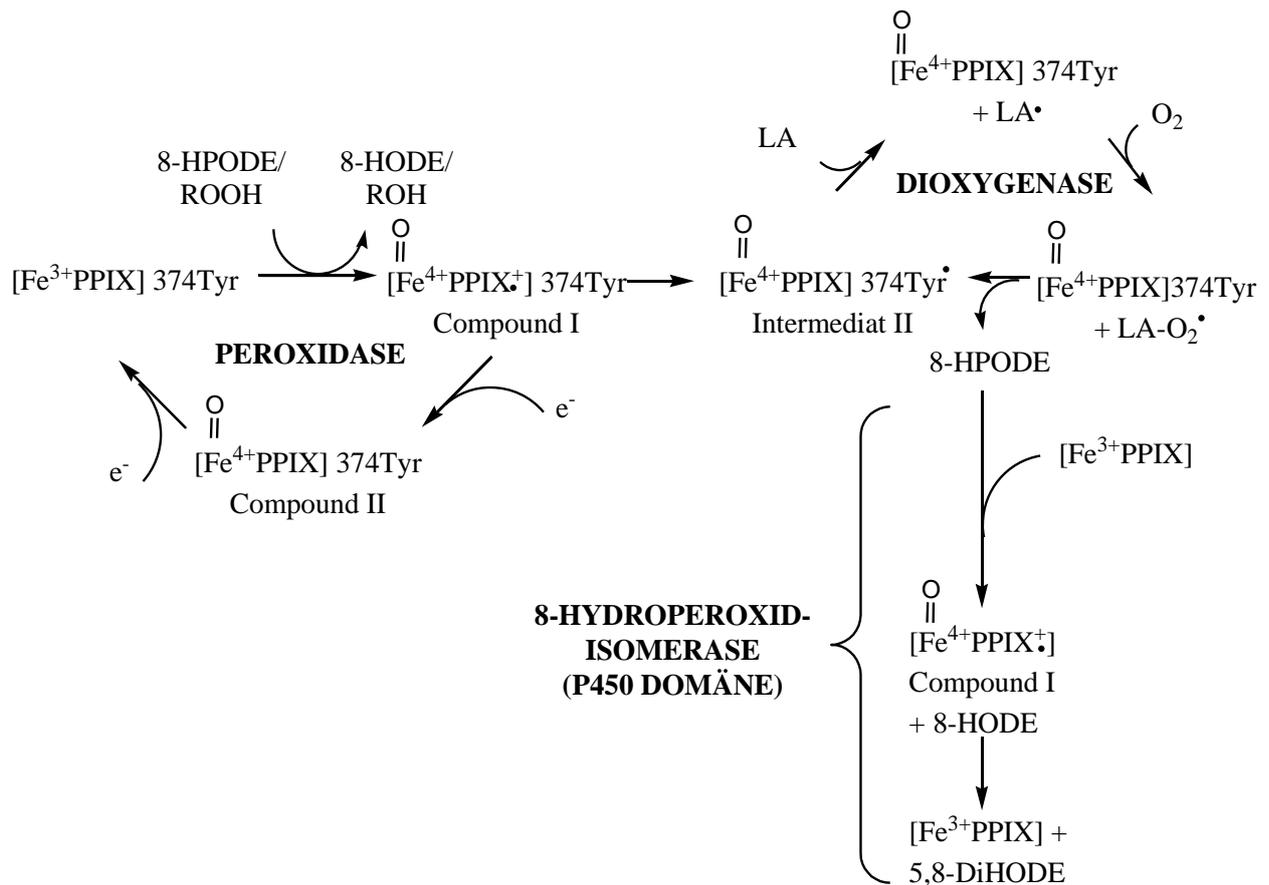
Reaktionen vollkommen unabhängig voneinander stattfinden können. Dieser Befund stellt somit eine weitere Evidenz für die Existenz von zwei getrennten Protein-Domänen dar.

Die Ausschaltung der Cytochrom-P450-Domäne durch den Austausch von His-1004 oder Cys-1006 gegen Ala führte zwar zu einer Inhibierung der 8-Hydroperoxid-Isomerase-Aktivität, doch erschien die Peroxidase-Aktivität hiervon unbeeinflusst zu sein. Es kann somit angenommen werden, dass die Häm-Gruppe in der Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne für die initiale Aktivierung des Enzyms durch Hydroperoxide benötigt wird, wie es auch für die PGHS bekannt ist (Smith *et al.*, 2000). Ähnlich wie bei der Reaktion der PGHS werden die aktivierenden Hydroperoxide so zu den korrespondierenden Hydroxiden reduziert. Interessanterweise zeigte sich, dass in der Gegenwart von TMPD bevorzugt die Peroxidase-Reaktion abläuft, wohingegen die 8-Hydroperoxid-Isomerase-Aktivität herabgesetzt erschien (siehe 3.2.8). Dies könnte in Analogie zu dem Mechanismus der PGHS andeuten, dass *Compound I* bzw. Intermediat II, welches während der Peroxidase-Reaktion gebildet wird, in der Gegenwart eines externen Elektronen-Donors zu *Compound II* und anschließend weiter zum nativen Enzym reduziert werden kann. Von dem nativen Enzym ausgehend kann dann ein neuer Peroxidase-Zyklus beginnen (Smith *et al.*, 2000).

Alle in diesem Abschnitt diskutierten Ergebnisse lassen vermuten, dass PpoA für die Synthese von 5,8-DiHODE wahrscheinlich zwei unterschiedliche Häm-bindende Domänen verwendet, wie es in Abb. 37 zusammenfassend dargestellt wird. Der erste Reaktionsschritt ist die Oxidation von 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> zu 8R-HPODE und wird in der Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne durch einen der PGHS ähnlichen Reaktionsmechanismus katalysiert. Hierbei wird das Enzym durch die Reduktion eines Hydroperoxids zu dem entsprechenden Hydroxid zunächst aktiviert und *Compound I* wird gebildet. Diese reaktive Oxo-Eisen-Spezies wird durch einen intramolekularen Elektronentransfer zu Intermediat II reduziert und das Tyr-374-Radikal wird gebildet. Dieses wird für die Abstraktion eines Wasserstoffatoms vom C-8 der 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> verwendet und ein kohlenstoffzentriertes Fettsäure-Radikal wird gebildet. Durch die folgende Reaktion mit molekularem Sauerstoff wird Peroxy-18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> gebildet. Dieses wird anschließend zu 8R-HPODE reduziert, indem erneut ein Wasserstoff vom katalytischen Tyrosin (Tyr-374) abgespalten wird.

Alternativ kann das im ersten Schritt gebildete *Compound I* auch durch einen intermolekularen Elektronen-Transfer von einem externen Elektronen-Donor ausgehend zu *Compound II* reduziert werden. Durch eine weitere Reduktion wird das native Enzym wieder gebildet.

Die im zweiten Reaktionsschritt folgende Isomerisierung des intermediär gebildeten 8R-HPODE zu 5,8-DiHODE wird in der C-terminalen Cytochrom-P450-Domäne katalysiert. Es kann angenommen werden, dass dieser letzte Schritt in Analogie zu den Mechanismen der AOS oder PGIS über die intermediäre Bildung von *Compound I* erfolgt wie in Abb. 37 gezeigt.



**Abb.37. Hypothetischer Katalyse-Mechanismus für die Reaktion von PpoA mit 18:2<sup>A9Z,12Z</sup>.** Die Aktivierung des Enzyms durch die Reduktion von Hydroperoxiden zu den entsprechenden Hydroxiden stellt den initialen Schritt der Reaktion dar. Das hierbei gebildete *Compound I* wird entweder durch eine intramolekulare Reduktion zu Intermediat II unter der Bildung eines Radikals am Tyr-374 umgewandelt, oder es wird durch eine intermolekulare Reduktion durch einen externen Elektronen-Donor (z.B. TMPD) zu *Compound II* und weiter zum nativen Häm reduziert. Das Radikal an Tyr-374 wird für die Bildung eines kohlenstoffzentrierten Fettsäureradikals benutzt. Durch die folgende Reaktion mit molekularem Sauerstoff wird ein Peroxyl-Radikal gebildet, welches durch die Übertragung eines Wasserstoffatoms von Tyr-374 zu 8*R*-HPODE reduziert wird. Das so entstandene Tyr-Radikal steht somit für eine weitere Dioxygenase-Reaktion zur Verfügung. 8*R*-HPODE dient als Substrat für die folgende 8-Hydroperoxid-Isomerase-Reaktion in der Cytochrom-P450-Domäne, bei der es zu 5,8-DiHODE unter Bildung von *Compound I* isomerisiert wird. Alternativ kann 8*R*-HPODE auch für die Aktivierung eines weiteren PpoA-Moleküls durch die Peroxidase-Reaktion genutzt werden, bei der es zu 8*R*-HODE reduziert wird. Ppo, Psi-Faktor-produzierende-Oxygenase; PPIX, Protoporphyrin IX; LA, 18:2<sup>A9Z,12Z</sup>.

## 4.2 Biochemische Eigenschaften von PpoC im Vergleich zu PpoA

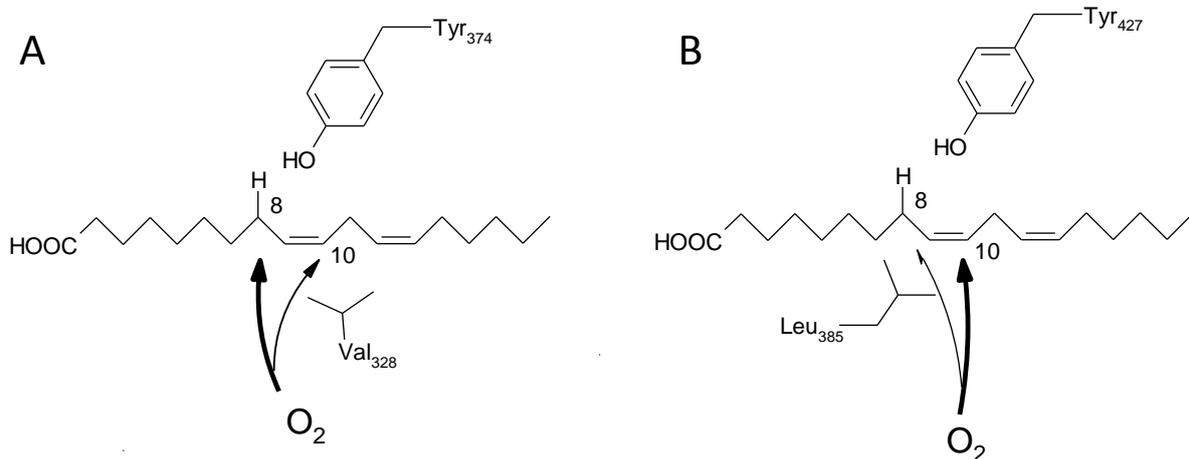
Es konnte für PpoC gezeigt werden, dass dieses Enzym im Gegensatz zu PpoA 18:2<sup>A9Z,12Z</sup> bevorzugt am C-10 oxidiert und so 10-H(P)ODE bildet. Außerdem wurde die Bildung von geringen Mengen an 8*R*-H(P)ODE, 10-KODE und 12,13-Ep-10-HOME nachgewiesen (siehe Abb. 32). Ein ähnliches Produktspektrum wurde ebenfalls von Oliw und Mitarbeitern für die Inkubation von 18:2<sup>A9Z,12Z</sup> mit *A. nidulans* Zellextrakt beschrieben, in dem das *ppoA*-Allel ausgeschaltet war. Es wurde postuliert, dass PpoC die katalytische Aktivität einer 10*R*-Dioxygenase besitzt und für die Bildung von 10*R*-H(P)ODE in *A. nidulans* verantwortlich ist (Garscha *et al.*, 2007). In einer späteren Arbeit wurde

PpoC aus *A. fumigatus* rekombinant exprimiert und als eine 10*R*-Dioxygenase identifiziert (Garscha und Oliw, 2009). Untersuchungen mit isotoopenmarkierten Fettsäuren zeigten, dass die Oxidation am C-10 über eine Abspaltung des pro*S*-Wasserstoffs am C-8 und einer anschließenden Verschiebung der Doppelbindung von Position  $\Delta 9$  zu Position  $\Delta 8$  erfolgt (Garscha *et al.*, 2007). Interessanterweise scheint die  $\Delta 12$ -Doppelbindung von 18:2 <sup>$\Delta 9Z,12Z$</sup>  und 18:3 <sup>$\Delta 9Z,12Z,15Z$</sup>  einen starken Einfluss auf den Sauerstoffeinbau am C-10 zu haben; 18:1 <sup>$\Delta 9Z$</sup>  besitzt keine Doppelbindung an dieser Position und wurde bevorzugt am C-8 zu 8-HOME oxidiert (siehe Tab. 6)

Es kann angenommen werden, dass die Dioxygenase-Reaktion in Analogie zu PpoA in der N-terminalen Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne katalysiert wird. So zeigten Aminosäuresequenzvergleiche (siehe Abb. 9), dass in der PpoC-Sequenz ebenfalls das katalytische Tyrosin (Tyr-427) konserviert ist, welches für die enzymatische Aktivität von PpoA (Tyr-374), PGHS (Tyr-385 in *O. aries* PGHS-1 bzw. Tyr-370 in *O. aries* PGHS-2) und 7,8-LDS (Tyr-376) essentiell ist. Der Austausch dieses Tyrosins durch Phenylalanin führte in diesen Enzymen zu einer Inhibierung der Dioxygenase-Aktivität (Garscha und Oliw, 2008b, Garscha und Oliw, 2008a, Thuresson *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass dieser Austausch in Analogie zu PpoA auch in PpoC zu einem Verlust der Dioxygenase-Aktivität führt. Somit kann angenommen werden, dass PpoC für diese Reaktion ebenfalls ein Tyrosyl-Radikal bildet, welches in einem ersten Reaktionsschritt ein Wasserstoffatom vom C-8 der 18:2 <sup>$\Delta 9Z,12Z$</sup>  abspaltet. Das entstehende ungepaarte Elektron ist delocalisiert und kann vom C-8 zum C-10 wandern, wie es auch von Oliw und Mitarbeiter diskutiert wurde (Garscha und Oliw, 2007). Die Existenz dieser beiden kohlenstoffzentrierten Radikale konnte sowohl für die Reaktion von 18:2 <sup>$\Delta 9Z,12Z$</sup>  mit PpoA (siehe 3.2.6.4) wie auch für die Reaktion mit PpoC (siehe 3.3.6) durch Experimente nachgewiesen werden, in denen die gebildeten Radikale mit dem Radikalfänger Cm $\Delta$ P abgefangen wurden.

Welche Aminosäurereste steuern den gerichteten Einbau von Sauerstoff am C-8 bzw. C-10 ? Aminosäuresequenzvergleiche von PpoA und PpoC mit den Aminosäuresequenzen der 7,8-LDS und PGHS zeigten, dass PpoA an Position 328 ein Valin besitzt, während PpoC an dieser Position ein Leucin (Leu-385) aufweist (siehe Abb. 9A). Interessanterweise findet sich in den Aminosäuresequenzen der 7,8-LDS und PGHS an dieser Stelle ebenfalls ein Valin. Es wurde bereits berichtet, dass der Austausch des entsprechenden Valins in der PGHS durch Leucin bzw. Alanin die Oxidation am C-15 bzw. C-11 erhöhte (Thuresson *et al.*, 2001). Zudem wurde kürzlich berichtet, dass durch den Austausch von Leu-384 in der 10*R*-Dioxygenase aus *A. fumigatus* gegen größere bzw. kleinere Aminosäure die Oxidation am C-8 bzw. C-10 bevorzugt wird (Garscha und Oliw, 2009). Da ähnliche Effekte für den Austausch des homologen Aminosäurerests Val-330 in 7,8-LDS gefunden wurden, wurde von Oliw und Mitarbeitern ein generelles Modell vorgeschlagen, das erklärt, wie die Oxidation am C-8 bzw. C-10 kontrolliert wird: Es wurde postuliert, dass die Größe der Aminosäure an Position 384 der 10*R*-Dioxygenase aus *A. fumigatus* bzw. 330 der 7,8-LDS aus *G. graminis* den Einbau des Sauerstoffatoms am C-8 bzw. C-10 dirigiert. Im Falle der 10*R*-Dioxygenase schirmt Leu-

384 im aktiven Zentrum des Enzyms das C-8 der 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> derart ab, dass der Sauerstoffeinbau nur am C-10 erfolgen kann. Im Fall der 7,8-LDS befindet sich an dieser Position ein Valin (Val-330), welches durch die im Vergleich zu Leucin kleinere Aminosäureseitenkette das C-8 der 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> schlechter abschirmt und so zu einer bevorzugten Oxidation am C-8 führt (Garscha und Oliw, 2009). Um weitere Einblicke in diesen Oxidationsmechanismus zu erlangen, wurden die entsprechenden Aminosäurereste in PpoA (Val-328) und PpoC (Leu-385) mutiert. Der Austausch von Leu-385 gegen Ala bzw. Val in der PpoC Sequenz führte zu ähnlichen Effekten, wie sie bereits durch Oliw und Mitarbeiter berichtet wurden. So wurde durch den Austausch von Leu-385 gegen die beiden kleineren Aminosäuren Alanin und Valin die Oxidation am C-8 bevorzugt. Es kann angenommen werden, dass Leu-385 im aktiven Zentrum der PpoC das C-8 vor dem Sauerstoffangriff abschirmt und so die Oxidation am C-10 bedingt (siehe Abb. 38A). Interessanterweise zeigte der Austausch von Val-328 in PpoA einen anderen Effekt. Es zeigte sich, dass der Austausch von Val-328 gegen die kleinere Aminosäure Alanin zu einer bevorzugten Oxidation am C-10 führte, während der Austausch gegen die größere Aminosäure Leucin zu einer bevorzugten Oxidation am C-8 führte. Dies könnte andeuten, dass Val-328 im aktiven Zentrum der PpoA das C-10 sterisch abschirmt (siehe Abb. 38B). Diese unterschiedlichen sterischen Effekte in PpoA und PpoC könnten durch eine andere Positionierung oder sogar Orientierung der Fettsäure in den aktiven Zentren der beiden Enzyme erklärt werden und widersprechen einem generellen Modell, das den Einfluss der Aminosäuren auf die Oxidationsposition erklärt.



**Abb.38. Einfluss der Aminosäuren auf die bevorzugte Oxidationsposition am Fettsäurerückgrat.** A. Das Modell zeigt, wie Val-328 im aktiven Zentrum der PpoA das C-10 vor der Oxidation durch Sauerstoff abschirmt. B. Das Modell zeigt, wie Leu-385 im aktiven Zentrum der PpoC das C-8 vor der Oxidation durch Sauerstoff abschirmt.

Oliw und Mitarbeiter berichteten, dass rekombinante 7,8-LDS eine äußerst schwache Isomerase-Aktivität besitzt, so dass 8*R*-H(P)ODE während der Reaktion akkumuliert (Garscha und Oliw, 2008a, Garscha und Oliw, 2008b). Zwar schwankte die 8-Hydroperoxid-Isomerase-Aktivität in vielen Experimenten für PpoA auch erheblich, doch stellte 5,8-DiHODE meist das Hauptprodukt der Reaktion dar. Es kann angenommen werden, dass durch die 8-Hydroperoxid-Isomerase-Aktivität 8*R*-HPODE aus dem Gleichgewicht der Reaktion mit PpoA entzogen wird, während dies im Falle der rekombinanten 7,8-LDS nicht der Fall ist. Dies könnte die unterschiedlichen Ergebnisse für PpoA und 7,8-LDS erklären.

Die hier präsentierten Daten lassen jedoch vermuten, dass es entweder kein generelles Modell gibt, das die Oxidation in 10*R*-Dioxygenasen und 8*R*-Dioxygenasen erklären kann oder, dass die Funktion der untersuchten Aminosäuren bisher noch nicht bis ins Detail verstanden ist. Eine Kristallstruktur beider Enzyme könnte hier weitere Einblicke liefern.

Weiterhin wurden die Produkte der Dioxygenase-Reaktion von PpoA und PpoC untersucht und miteinander verglichen. Wie bereits erwähnt, wurde in der Dioxygenase-Reaktion von PpoA mit 18:2<sup>Δ<sup>9Z</sup>,12Z</sup> 8*R*-HPODE gebildet, welches in der folgenden 8-Hydroperoxid-Isomerase-Reaktion zu 5,8-DiHODE umgewandelt wurde. Während 8*R*-HPODE stabil war und leicht isoliert werden konnte, erschien das während der Reaktion von PpoC und 18:2<sup>Δ<sup>9Z</sup>,12Z</sup> gebildete 10-HPODE instabil zu sein und wurde in eine Vielzahl verschiedener weiterer Produkte umgewandelt. Das Hauptprodukt dieser nachgeschalteten Reaktionen war 10-HODE (siehe Abb. 32E), welches wahrscheinlich durch eine enzymatische Peroxidase-Reaktion innerhalb der Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne gebildet wurde (siehe 3.3.6).

Weitere Produkte, die von 10-HPODE ausgehend gebildet wurden, waren 10-KODE, 10-ODA und die volatilen C<sub>8</sub>-Körper 2-Octen-1-ol, 2-Octenal, 3-Octanon und 1-Octen-3-ol (siehe Tab. 6). Letzterer ist verantwortlich für den charakteristischen Pilzgeruch und wurde zudem in *Lentinus decatetes* (Matsui *et al.*, 2003), *Psalliota bispora* (Wurzenberger und Grosch, 1984a, Wurzenberger und Grosch, 1984b, Wurzenberger und Grosch, 1984c) und *Tricholoma matsutake* (Akakabe *et al.*, 2005) nachgewiesen. Es wird angenommen, dass in diesen Pilzen bisher unbekannte Lyasen die Spaltung von 10-HPODE in 10-ODA und volatile C<sub>8</sub>-Körper katalysieren. Obwohl diese Reaktionen seit nun mehr als 25 Jahren bekannt sind, konnten die entsprechenden Enzyme bisher nicht identifiziert werden. Als einzige Katalysatoren für derartige Reaktionen wurden bisher FeSO<sub>4</sub>, FeCl<sub>3</sub>-Cystein, Hämatin und Hämoglobin identifiziert (Labeque und Marnett, 1987). In einer kürzlich erschienenen Untersuchung konnte zudem gezeigt werden, dass 1-Octen-3-ol in *L. decatetes* und *T. matsutake* ausschließlich von 10*S*-HPODE ausgehend gebildet wird und selbst ebenfalls *S*-Konfiguration besitzt (Akakabe *et al.*, 2005). Bisher konnte nicht geklärt werden, ob 1-Octen-3-ol auch aus 10*R*-HPODE gebildet werden kann.

Interessanterweise wurde die Bildung von 1-Octen-3-ol außer in Pilzen auch in dem Moos *Physcomitrella patens* nachgewiesen (Wichard *et al.*, 2005). Hier verwendet eine bifunktionale LOX

20:4<sup>Δ5Z,8Z,11Z,14Z</sup> als Substrat und katalysiert die Synthese von 1-Octen-3-ol über die intermediäre Bildung des 12S-Hydroperoxy-Derivats dieser Fettsäure (Senger *et al.*, 2005). Da diese Reaktion ebenfalls durch die Aktivität einer Dioxygenase initiiert wird, könnte angenommen werden, dass PpoC und diese LOX einen ähnlichen Reaktionsmechanismus hierfür verwenden. Allerdings ist es schwer eine sichere Aussage über eine enzymatische oder nicht enzymatische Umwandlung zu treffen, da die während der Reaktion von PpoC und 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> gebildeten Mengen an 1-Octen-3-ol äußerst gering waren.

Als weiteres Produkt der Reaktion von PpoC mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> wurde der Epoxyalkohol 12,13-Ep-10-HOME nachgewiesen. Die Bildung dieses Produkts wurde außerdem von Oliw und Mitarbeitern für die Reaktion der 10R-Dioxygenase aus *A. fumigatus* mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> beschrieben (Garscha und Oliw, 2009). Es wurde angenommen, dass dieses Enzym eine EAS-Aktivität aufweist und in Analogie zu der Isomerase-Aktivität der 7,8-LDS spezifisch 10R-HPODE zu 12,13-Ep-10-HOME isomerisiert (Garscha und Oliw, 2009). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde die Reaktion von PpoC und 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> unter einer mit <sup>18</sup>O<sub>2</sub> angereicherten Atmosphäre durchgeführt. Die Analyse mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> zeigte, dass beide Sauerstoffatome des 12,13-Ep-10-HOME vom gleichen Sauerstoffmolekül stammen (siehe Abb. 34). Außerdem wurde ein Experiment durchgeführt, in dem isoliertes 10-HPODE mit PpoC inkubiert wurde. Die anschließende Analyse mittels RP-HPLC/MS<sup>2</sup> zeigte, dass 12,13-Ep-10-HOME von 10-HPODE ausgehend gebildet wird (siehe Abb. 35). Allerdings sind die gebildeten Mengen dieses Produkts sehr gering und es handelt sich mit einem relativen Vorkommen von 3 % (vgl. Abb. 32E) offensichtlich nicht um das Hauptprodukt der Reaktion. Somit kann angenommen werden, dass die Epoxyalkohole lediglich durch eine Nebenreaktion gebildet werden.

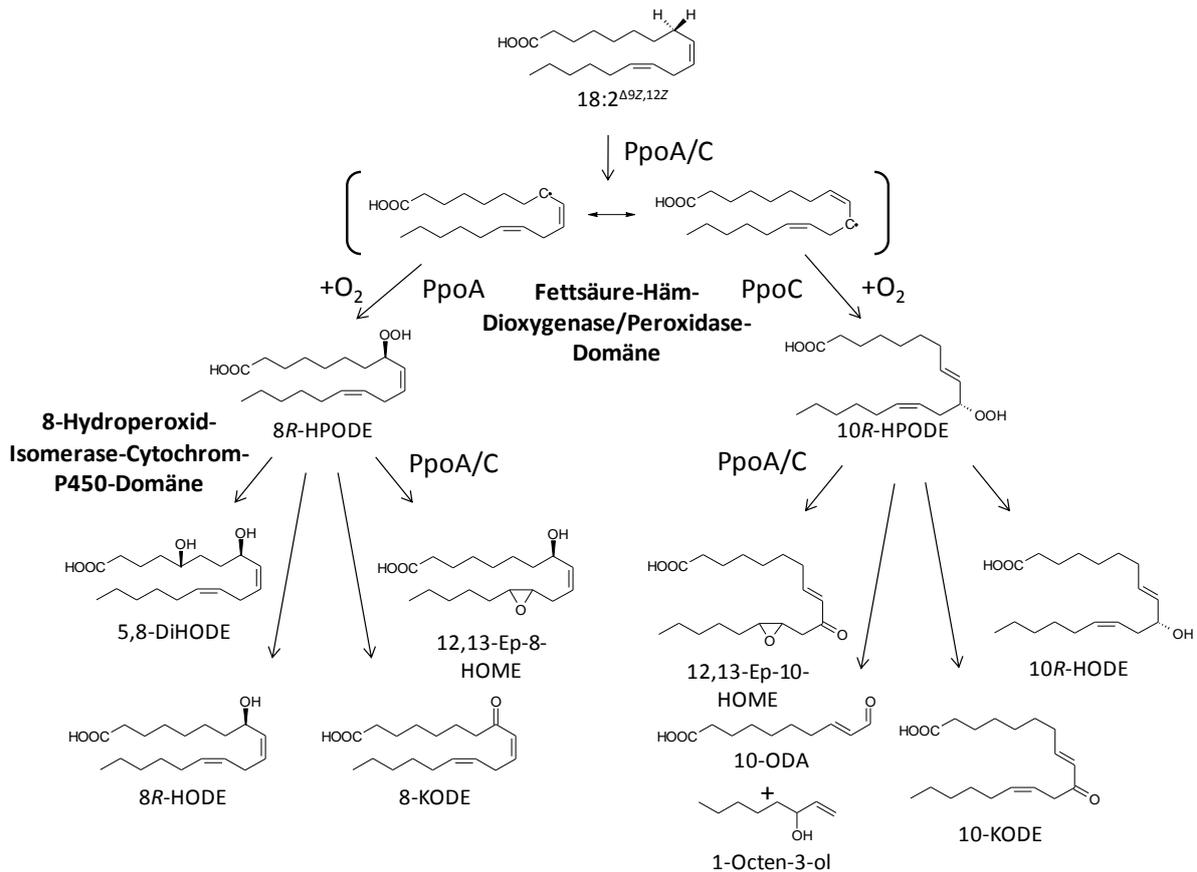
Inkubationen von PpoC mit 8R-HPODE führten zur Bildung von 12,13-Ep-8-HOME (siehe Abb. 35), es konnte jedoch keine Bildung von 5,8-DiHODE beobachtet werden. Vor dem Hintergrund, dass PpoC scheinbar keine vollständig konservierte Cytochrom-P450-Domäne besitzt, unterstreicht dieser Befund die Notwendigkeit dieser Domäne für die 8-Hydroperoxid-Isomerase-Aktivität.

Weiterhin wurde PpoA auf eine mutmaßliche EAS-Aktivität untersucht. Wie bereits beschrieben, wurde bei Inkubationen von PpoA mit 8R-HPODE vornehmlich die Bildung von 5,8-DiHODE beobachtet und es konnten nur geringe Mengen an 12,13-Ep-8-HOME nachgewiesen werden (siehe Abb. 18). Zudem zeigten Inkubationen von PpoA mit 10-HPODE, dass bei dieser Reaktion 12,13-Ep-10-HOME aber kein 5,8-DiHODE gebildet wird. Der Befund, dass die relative Menge an gebildeten 12,13-Ep-10-HOME in diesen Experimenten direkt mit der eingesetzten Enzymkonzentration korrelierten (Abb. 18B), ist ein Indiz für eine EAS-Aktivität von PpoA.

Wie oben diskutiert, wird die 8-Hydroperoxid-Isomerase Reaktion von PpoA wahrscheinlich in der C-terminalen Cytochrom-P450-Domäne katalysiert. Vor dem Hintergrund, dass diese Domäne in PpoC durch den fehlenden fünften Häm-Eisen-Liganden (Cystein) scheinbar degeneriert ist (siehe Abb. 9B), sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob eine Rekonstitution der

Cytochrom-P450-Domäne durch den gerichteten Einbau von Cystein möglich ist und damit eine Isomerase-Aktivität von PpoC künstlich erzeugt werden kann. Die entsprechende PpoC-Variante (PpoC\_G1039C) zeigte weder mit 8*R*-HPODE noch mit 10-HPODE eine Isomerase-Aktivität. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass noch zwei weitere Aminosäurereste des Häm-Bindungssignatur-Motivs in PpoC nicht konserviert sind (siehe Abb. 9). Ein Austausch der degenerierten Cytochrom-P450-Domäne von PpoC durch die scheinbar funktionale Cytochrom-P450-Domäne von PpoA könnte in diesem Kontext einen tieferen Einblick ermöglichen.

Die folgende Abbildung soll die verschiedenen Haupt- und Nebenaktivitäten von PpoA und PpoC am Beispiel der Reaktion mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> zusammenfassend darstellen: In einem ersten Reaktionsschritt spalten Ppo-Enzyme ein Wasserstoffatom vom C-8 der 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> ab und bilden so ein kohlenstoffzentriertes Fettsäure-Radikal. Diese Reaktion erfolgt wahrscheinlich in der Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne durch die Bildung eines Tyrosyl-Radikals. Im Fall von PpoA greift molekularer Sauerstoff am C-8 des Fettsäurerückgrats an und 8*R*-HPODE wird so gebildet. Dieses intermediär gebildete Zwischenprodukt dient entweder als Substrat für eine Peroxidase-Reaktion, bei der dieses zu 8*R*-HODE reduziert wird, oder es dient als Substrat für die 8-Hydroperoxid-Isomerase-Reaktion, bei der 5,8-DiHODE gebildet wird. Es wird angenommen, dass diese Reaktion in der Cytochrom-P450-Domäne katalysiert wird. Außerdem kann 8*R*-HPODE auch in 8-KODE umgewandelt werden. Im Falle der PpoC wandert das zunächst am C-8 gebildete kohlenstoffzentrierte Radikal zum C-10, wobei die Δ9-Doppelbindung an Position Δ8 verschoben wird. Der Sauerstoffeinbau erfolgt bevorzugt am C-10 und 10-HPODE wird gebildet. Dieses Produkt ist instabil und wird entweder zu 10-KODE oxidiert oder in 10-ODA und verschiedene flüchtige C<sub>8</sub>-Körper, wie z.B. 1-Octen-3-ol gespalten. Außerdem kann 10-HPODE auch zu 10-HODE reduziert oder zu 12,13-Ep-10-HOME umgewandelt werden.



**Abb.39. Die Synthese von Oxylipinen in *A. nidulans* am Beispiel der Reaktion mit 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup>.** Der erste Schritt der Oxylipin-Biosynthese ist die Abspaltung eines Wasserstoffatoms vom C-8 der 18:2<sup>Δ9Z,12Z</sup> durch ein in der Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne gebildetes Tyrosyl-Radikal. Das so gebildete kohlenstoffzentrierte Fettsäure-Radikal wird im Fall der PpoA am C-8 von molekularem Sauerstoff angegriffen und 8R-HPODE wird intermediär gebildet. Durch die folgende 8-Hydroperoxid-Isomerase Reaktion in der Cytochrom-P450-Domäne wird 8R-HPODE zu 5,8-DiHODE isomerisiert. Außerdem kann 8R-HPODE durch die Peroxidase-Domäne zu 8R-HODE reduziert werden oder es wird zu 8-KODE oxidiert. Im Fall der PpoC findet eine Verschiebung des zunächst am C-8 gebildeten kohlenstoffzentrierten Radikals zum C-10 statt, wobei die Δ9-Doppelbindung an Position Δ8 verschoben wird. Der Sauerstoffeinbau erfolgt bevorzugt an Position C-10 und 10-HPODE wird gebildet. Dieses instabil erscheinende Produkt wird entweder zu 10-KODE oxidiert oder in 10-ODA und flüchtige C<sub>8</sub>-Körper (z.B. 1-Octen-3-ol) gespalten. Außerdem kann es in der Peroxidase-Reaktion zu 10-HODE reduziert werden. Alternativ kann es zudem in kleine Mengen zu 12,13-Ep-10-HOME isomerisiert werden. Ppo, Psi-Faktor-produzierende-Oxygenase; H(P)ODE, Hydro(pero)xyoctadecadiensäure; KODE, Ketoctadecadiensäure; DiHODE, Dihydroxyoctadecadiensäure; 12,13-Ep-8/10-HOME, 12,13-Epoxy-8/10-hydroxyoctadecensäure.

### 4.3 Ausblick

Zur detaillierten Aufklärung des Reaktionsmechanismus von PpoA ist eine Kristallstruktur des Enzyms nötig. Es wurden im Rahmen der vorliegenden Dissertation bereits verschiedene Kristallisationsbedingungen getestet und Bedingungen gefunden, bei denen Kristallwachstum beobachtet werden konnte. Diese könnten ein guter Ausgangspunkt für weitere Tests sein. Es wäre hier interessant, die Orientierung und Bindung der Fettsäuren bzw. Fettsäure-Derivate in den aktiven Zentren zu untersuchen und mögliche Wege einer Kommunikation zwischen den aktiven Zentren zu

analysieren. Außerdem könnten so verschiedene weitere Aminosäurereste identifiziert werden, die an der Reaktion beteiligt sind und somit für folgende Mutagenesestudien interessant wären.

Des Weiteren würde eine zeitaufgelöste spektroskopische Analyse mit der *stopped-flow*-Technik tiefere Einblicke in den Reaktionsmechanismus liefern. Sowohl Fettsäure-Häm-Dioxygenasen/Peroxidasen wie auch Cytochrom-P450-Enzyme bilden während der Reaktion mit Substraten verschiedene Intermediate (z.B. *Compound I* und *Compound II*), deren Absorptionseigenschaften sich deutlich von denen des nativen Enzyms unterscheiden. In der Literatur sind bereits zahlreiche dieser verschiedenen Spektren beschrieben, die hierzu als Vergleich verwendet werden könnten (Makris *et al.*, 2006). In diesem Kontext sind auch weitere Untersuchungen mit deuterierten Substraten interessant. Diese könnten zum einen dazu verwendet werden unterschiedliche Intermediate während der Reaktion verschiedenen Prozessen zuzuordnen; zum anderen könnten *stopped-flow*-Analysen auch zeigen, ob der hohe *KIE* für die Reaktion von PpoA mit am C-8 deuterierter Fettsäure durch eine multiplikative Erhöhung verschiedener primärer *KIE* oder durch einen Tunnel-Effekt hervorgerufen wird.

Außerdem können weitere ESR-Spektroskopie Analysen zusätzliche Informationen über die Reaktion von PpoA geben. So konnte zwar mittels ESR die Bildung eines Radikals beobachtet werden, bei dem es sich wahrscheinlich um ein Tyrosyl-Radikal handelt, doch ist die Position dieses Radikals bisher unbekannt. Die Homologie zu den verschiedenen PGHS-Isoformen sowie Experimente mit PpoA-Y374F deuten an, dass sich das beobachtete Radikal am Tyr-374 im aktiven Zentrum von PpoA befindet. Allerdings wäre es auch denkbar, dass das Radikal initial am Tyr-374 gebildet wird und anschließend zu einem anderem Tyrosin im aktiven Zentrum wandert. Der Austausch von Tyr-374 gegen verschiedene Tyrosin-Derivate (z.B. DOPA, Dihydroxyphenylalanin) könnte hierzu nützlich sein. In den letzten Jahren sind verschiedene Methoden für den Einbau solcher nicht kanonischen Aminosäuren entwickelt worden (Noren *et al.*, 1989, Neumann *et al.*, 2008, Cellitti *et al.*, 2008).

Ferner können *in vivo* Studien weitere Anhaltspunkte für physiologische Funktionen liefern. So könnten die verschiedenen PpoA-Varianten oder PpoC-Varianten in die unterschiedlichen *Appo-A. nidulans* Stämme transformiert und dort exprimiert werden. Es könnte so der Effekt der verschiedenen Punktmutationen auf den Entwicklungszyklus und die Mycotoxinproduktion in dem Pilz untersucht werden. In diesem Kontext bedarf es zudem auch Analysen der biochemischen Eigenschaften von PpoB. Aminosäuresequenzvergleiche zeigten, dass dieses Enzym wie PpoA eine konservierte Cytochrom-P450-Domäne besitzt, so dass eine 8-Hydroperoxid-Isomerase Aktivität angenommen werden kann. Interessanterweise zeigte die N-terminale Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne hingegen eine besondere Ähnlichkeit zu der von PpoC. Wie im Fall der PpoC besitzt auch PpoB ein konserviertes Leucin, das das C-8 der Fettsäure sterisch abschirmen und so für die Steuerung des Sauerstoffeinbaus verantwortlich sein könnte. Es kann somit angenommen werden, dass PpoB ebenfalls Fettsäuren an Position C-10 oxidiert.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Psi-Faktor produzierende Oxygenasen, sogenannte Ppo-Enzyme, charakterisiert, die eine regulatorische Funktion für die Entwicklung und Mycotoxinproduktion in *A. nidulans* besitzen. Bioinformatische Analysen zeigten, dass Ppo-Enzyme im N-terminalen Sequenzabschnitt eine hohe Homologie zu Fettsäure-Häm-Dioxygenasen/Peroxidasen aufweisen, während der C-terminale Sequenzabschnitt den Cytochrom-P450-Enzymen ähnelt.

Um die biochemischen Eigenschaften von PpoA und PpoC zu untersuchen, wurde ein heterologes Expressionssystem in *E. coli* und ein Proteinreinigungsprotokoll etabliert. Während PpoA sich mit großen Proteinausbeuten stabil bis zur Homogenität reinigen ließ, war PpoC in gereinigter Form instabil und verlor die enzymatische Aktivität innerhalb weniger Minuten.

PpoA wurde als homotetrameres Häm-Protein identifiziert, das die Oxidation von einfach und mehrfach ungesättigten Fettsäuren katalysiert. Auf der Basis von Aminosäuresequenzvergleichen, einem charakteristischen Häm-CO-Spektrum und ESR-Spektroskopie-Analysen konnte die Cytochrom-P450-Domäne nachgewiesen werden. Untersuchungen des Reaktionsmechanismus zeigten, dass PpoA zwei verschiedene Häm-bindende Domänen verwendet, um zwei voneinander getrennt ablaufende Reaktionen zu katalysieren. In der Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne wird 18:2<sup>A9Z,12Z</sup> zu 8*R*-HPODE oxidiert, indem in einem initialen Reaktionsschritt ein Tyrosyl-Radikal gebildet wird, welches ein Wasserstoffatom vom C-8 der Fettsäure abspaltet. Es entsteht ein kohlenstoffzentriertes Radikal, welches im folgenden Schritt mit molekularem Sauerstoff reagiert und 8*R*-HPODE bildet. Das so intermediär gebildete Zwischenprodukt wird in der Cytochrom-P450-Domäne anschließend zu 5,8-DiHODE isomerisiert.

Im Gegensatz zu PpoA scheint PpoC nur eine N-terminale Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne zu besitzen und katalysierte hauptsächlich die Oxidation von 18:2<sup>A9Z,12Z</sup> zu 10-HPODE und die weitere Reduktion zu 10-HODE. Es konnte keine Isomerase-Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings ist 10-HPODE instabil und wurde entweder zu 10-KODE oxidiert oder zerfiel zu 10-ODA und volatilen C<sub>8</sub>-Körpern, die unter anderem für den charakteristischen Pilzgeruch verantwortlich sind. Mutagenese-Studien wiesen darauf hin, dass PpoC wahrscheinlich einen ähnlichen Mechanismus für die Oxidation von 18:2<sup>A9Z,12Z</sup> verwendet wie PpoA und hierbei auch ein Tyrosyl-Radikal für die Abspaltung eines Wasserstoffatoms vom Fettsäurerückgrat gebildet wird. Es konnte gezeigt werden, dass die unterschiedlichen Positionen der Oxidation am Fettsäurerückgrat durch Aminosäurereste in der Fettsäure-Häm-Dioxygenase/Peroxidase-Domäne beeinflusst werden. Diese schirmen entweder das C-8 oder C-10 der Fettsäure vor dem Angriff von molekularem Sauerstoff sterisch ab.

## 6. Referenzen

- Akakabe, Y., Matsui, K. & Kajiwarra, T. (2005). Stereochemical correlation between 10-hydroperoxyoctadecadienoic acid and 1-octen-3-ol in *Lentinula edodes* and *Tricholoma matsutake* mushrooms. *Biosci Biotechnol Biochem*, 69: 1539-44.
- Alem, M.A. & Douglas, L.J. (2004). Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 41-7.
- Andre, E. & Hou, K.-W. (1932). The presence of a lipid oxidase in soybean, glycine soya. *Lieb C R Acad Sci (Paris)*, 194: 645-647.
- Andreou, A.-Z., Vanko, M., Bezakova, L. & Feussner, I. (2008). Properties of a mini 9R-lipoxygenase from *Nostoc* sp. PCC 7120 and its mutant forms. *Phytochemistry*, 69: 1832–1837.
- Andreou, A., Brodhun, F. & Feussner, I. (2009). Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog Lipid Res*, 48: 148-170.
- Auclair, K., Moenne-Loccoz, P. & De Montellano, P.R.O. (2001). Roles of the proximal heme thiolate ligand in cytochrome P450(cam). *J Am Chem Soc*, 123: 4877-4885.
- Ausubel, F.M., Brent, R.E., Kingston, D.D., Seidmann, J.R., Smith, J.A. & Struhl, K. (1993). *Current Protocols in Molecular Biology*, New York: Green Publishing Associates and John Wiley and Sons Inc.
- Berg, J., Tymoczko, J. & Stryer, L. (2004). *Biochemistry*, New York: WH Freeman.
- Blée, E. (1998). Biosynthesis of phytooxylipins: the Peroxygenase pathway. *Fett/Lipid*, 100: 121-127.
- Blumberg, W.E., Peisach, J., Wittenberg, B. & Wittenberg, J. (1968). Electronic Structure of Protoheme Proteins I. An Electron Paramagnetic Resonance and Optical Study of Horseradish Peroxidase and its Derivatives. *J Biol Chem*, 243: 1854-1862.
- Boeglin, W., Itoh, A., Zheng, Y., Coffa, G., Howe, G. & Brash, A. (2008). Investigation of substrate binding and product stereochemistry issues in two linoleate 9-lipoxygenases. *Lipids*, 43: 979-987.
- Bowers, W.S., Hoch, H.C., Evans, P.H. & Katayama, M. (1986). Thallphytic alleopathy: Isolation and identification of laetisaric acid. *Science*, 232: 105-106.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248-54.
- Brash, A.R., Boeglin, W.E. & Chang, M.S. (1997). Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 6148-6152.
- Brodhagen, M. & Keller, N.P. (2006). Signalling pathways connecting mycotoxin production and sporulation. *Molecular Plant Pathology*, 7: 285-301.

- Brodhun, F. (2006). Biochemische Charakterisierung von Ppo-Dioxygenasen aus *Aspergillus nidulans*. Hausarbeit im Rahmen der ersten Staatsprüfung für das Lehramt an Gymnasien, Georg-August-Universität, Abteilung Biochemie der Pflanze, Göttingen, Deutschland.
- Brodowsky, I.D., Hamberg, M. & Oliw, E.H. (1992). A linoleic acid (8*R*)-dioxygenase and hydroperoxide isomerase of the fungus *Gaeumannomyces graminis*. *J Biol Chem*, 267: 14738-14745.
- Brodowsky, I.D. & Oliw, E.H. (1992). Metabolism of 18:2(n - 6), 18:3(n - 3), 20:4(n - 6) and 20:5(n - 3) by the fungus *Gaeumannomyces graminis*: Identification of metabolites formed by 8-hydroxylation and by w<sub>2</sub> and w<sub>3</sub> oxygenation. *Biochim Biophys Acta*, 1124: 59-65.
- Bullock, W.D., Fernandez, J.M. & Hort, J.M.S. (1987). XL1-Blue: A high efficiency plasmid transformants recA *Escherichia coli* strain β-galactosidase selection. *BioTechniques*, 5: 376-378.
- Cellitti, S.E., Jones, D.H., Lagpacan, L., Hao, X., Zhang, Q., Hu, H., Brittain, S.M., Brinker, A., Caldwell, J., Bursulaya, B., Spraggon, G., Brock, A., Ryu, Y., Uno, T., Schultz, P.G. & Geierstanger, B.H. (2008). *In vivo* incorporation of unnatural amino acids to probe structure, dynamics, and ligand binding in a large protein by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Am Chem Soc*, 130: 9268-81.
- Champe, S.P. & El-Zayat, A.A. (1989). Isolation of a sexual sporulation hormone from *Aspergillus nidulans*. *J Bacteriol*, 171: 3982-8.
- Champe, S.P., Rao, P. & Chang, A. (1987). An endogenous inducer of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *J Gen Microbiol*, 133: 1383-7.
- Chiang, C.W., Yeh, H.C., Wang, L.H. & Chan, N.L. (2006). Crystal structure of the human prostacyclin synthase. *J Mol Biol*, 364: 266-74.
- Coffa, G. & Brash, A.R. (2004). A single active site residue directs oxygenation stereospecificity in lipoxygenases: Stereocontrol is linked to the position of oxygenation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 15579-15584.
- Coffa, G., Imber, A.N., Maguire, B.C., Laxmikanthan, G., Schneider, C., Gaffney, B.J. & Brash, A.R. (2005). On the Relationships of Substrate Orientation, Hydrogen Abstraction, and Product Stereochemistry in Single and Double Dioxygenations by Soybean Lipoxygenase-1 and Its Ala542Gly Mutant. *J Biol Chem*, 280: 38756-38766.
- Coon, M.J. (2005). Cytochrome P450: nature's most versatile biological catalyst. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45: 1-25.
- Cristea, M., Engstrom, A., Su, C., Hornsten, L. & Oliw, E.H. (2005). Expression of manganese lipoxygenase in *Pichia pastoris* and site-directed mutagenesis of putative metal ligands. *Arch Biochem Biophys*, 434: 201-211.

- Cristea, M. & Oliw, E.H. (2006). A G316A mutation of manganese lipoxygenase augments hydroperoxide isomerase activity: Mechanism of biosynthesis of epoxyalcohols. *J Biol Chem*, 281: 17612-17623.
- Cristea, M., Osbourn, A. & Oliw, E. (2003). Linoleate diol synthase of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Lipids*, 38: 1275-80.
- Dagenais, T.R.T., Chung, D., Giles, S.S., Hull, C.M., Andes, D. & Keller, N.P. (2008). Defects in conidiophore development and conidium-macrophage interactions in a dioxygenase mutant of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun*, 76: 3214-3220.
- Denisov, I.G., Makris, T.M., Sligar, S.G. & Schlichting, I. (2005). Structure and Chemistry of Cytochrome P450. *Chem Rev*, 105: 2253-2278.
- Dietz, R., Nastainczyk, W. & Ruf, H.H. (1988). Higher oxidation states of prostaglandin H synthase. Rapid electronic spectroscopy detected two spectral intermediates during the peroxidase reaction with prostaglandin G<sub>2</sub>. *Eur J Biochem*, 171: 321-8.
- Erb-Downward, J.R. & Noverr, M.C. (2007). Characterization of Prostaglandin E<sub>2</sub> Production by *Candida albicans*. *Infect Immun*, 75: 3498-3505.
- Feussner, I. & Wasternack, C. (2002). The lipoxygenase pathway. *Annu Rev Plant Biol*, 53: 275-297.
- Funk, C.D. (2001). Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, 294: 1871-5.
- Galagan, J.E., Calvo, S.E., Cuomo, C., Ma, L.J., Wortman, J.R., Batzoglou, S., Lee, S.I., Basturkmen, M., Spevak, C.C., Clutterbuck, J., Kapitonov, V., Jurka, J., Scacciochio, C., Farman, M., Butler, J., Purcell, S., Harris, S., Braus, G.H., Draht, O., Busch, S., D'enfert, C., Bouchier, C., Goldman, G.H., Bell-Pedersen, D., Griffiths-Jones, S., Doonan, J.H., Yu, J., Vienken, K., Pain, A., Freitag, M., Selker, E.U., Archer, D.B., Penalva, M.A., Oakley, B.R., Momany, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Asai, K., Machida, M., Nierman, W.C., Denning, D.W., Caddick, M., Hynes, M., Paoletti, M., Fischer, R., Miller, B., Dyer, P., Sachs, M.S., Osmani, S.A. & Birren, B.W. (2005). Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 438: 1105-15.
- Gardner, H.W. (1991). Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochim Biophys Acta*, 1084: 221-239.
- Garscha, U., Jerneren, F., Chung, D., Keller, N.P., Hamberg, M. & Oliw, E.H. (2007). Identification of dioxygenases required for *Aspergillus* development: Studies of products, stereochemistry, and the reaction mechanism. *J Biol Chem*, 282: 34707-34718.
- Garscha, U. & Oliw, E.H. (2007). Steric analysis of 8-hydroxy- and 10-hydroxyoctadecadienoic acids and dihydroxyoctadecadienoic acids formed from 8*R*-hydroperoxyoctadecadienoic acid by hydroperoxide isomerases. *Anal Biochem*, 367: 238-246.
- Garscha, U. & Oliw, E.H. (2008a). Critical amino acids for the (8*R*)-dioxygenase activity of linoleate diol synthase. A comparison with cyclooxygenases. *FEBS Lett*, 582: 3547-3551.

- Garscha, U. & Oliw, E.H. (2008b). Pichia expression and mutagenesis of 7,8-linoleate diol synthase change the dioxygenase and hydroperoxide isomerase. *Biochem Biophys Res Commun*, 373: 579-583.
- Garscha, U. & Oliw, E.H. (2009). Leucine/Valine Residues Direct Oxygenation of Linoleic Acid by (10*R*)- and (8*R*)-Dioxygenases: Expression and site-directed mutagenesis of (10*R*)-dioxygenase with epoxyalcohol synthase activity. *J Biol Chem*, 284: 13755-13765.
- Govindarajan, N. (2005). Biochemical analysis of fatty acid oxidizing enzymes from *Aspergillus nidulans*. Master-Arbeit, Georg-August-Universität, Abteilung Biochemie der Pflanze, Göttingen, Deutschland.
- Grechkin, A.N. & Hamberg, M. (2004). The "heterolytic hydroperoxide lyase" is an isomerase producing a short-lived fatty acid hemiacetal. *Biochim Biophys Acta*, 1636: 47-58.
- Guengerich, F.P. (2008). Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem Res Toxicol*, 21: 70-83.
- Hamberg, M. (1986). Isolation and structure of lipoxygenase from *Saprolegnia parasitica*. *Biochem Biophys Acta*, 876: 688-692.
- Hamberg, M. (1995). Hydroperoxide isomerases. *J Lipid Mediators Cell Signal*, 12: 283-292.
- Hamberg, M. & Samuelsson, B. (1967). On the specificity of the oxygenation of unsaturated fatty acids catalyzed by soybean lipoxidase. *J Biol Chem*, 242: 5329-5335.
- Hamberg, M., Su, C. & Oliw, E. (1998). Manganese lipoxygenase - Discovery of a bis-allylic hydroperoxide as product and intermediate in a lipoxygenase reaction. *J Biol Chem*, 273: 13080-13088.
- Hamberg, M., Zhang, L.Y., Brodowsky, I.D. & Oliw, E.H. (1994). Sequential oxygenation of linoleic acid in the fungus *Gaeumannomyces graminis* - stereochemistry of dioxygenase and hydroperoxide isomerase reactions. *Arch Biochem Biophys*, 309: 77-80.
- Hanano, A., Burcklen, M., Flenet, M., Ivancich, A., Louwagie, M., Garin, J. & Blee, E. (2006). Plant seed peroxygenase is an original heme-oxygenase with an EF-hand calcium binding motif. *J Biol Chem*, 281: 33140-33151.
- Haurand, M. & Ullrich, V. (1985). Isolation and characterization of thromboxane synthase from human platelets as a cytochrome P450 enzyme. *J Biol Chem*, 260: 15059-67.
- Hecker, M. & Ullrich, V. (1989). On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A<sub>2</sub> biosynthesis. *J Biol Chem*, 264: 141-50.
- Herman, R.P. & Hamberg, M. (1987). Properties of the soluble arachidonic acid 15-lipoxygenase and 15-hydroperoxide isomerase from the oomycete *Saprolegnia parasitica*. *Prostaglandins*, 34: 129-39.
- Hörnsten, L., Su, C., Osbourn, A.E., Garosi, P., Hellman, U., Wernstedt, C. & Oliw, E.H. (1999). Cloning of linoleate diol synthase reveals homology with prostaglandin H synthases. *J Biol Chem*, 274: 28219-28224.

- Hörnsten, L., Su, C., Osbourn, A.E., Hellman, U. & Oliw, E.H. (2002). Cloning of the manganese lipoxygenase gene reveals homology with the lipoxygenase gene family. *Eur J Biochem*, 269: 2690-2697.
- Horowitz Brown, S., Zarnowski, R., Sharpee, W.C. & Keller, N.P. (2008). Morphological transitions governed by density dependence and lipoxygenase activity in *Aspergillus flavus*. *Appl Environ Microbiol*, 74: 5674-5685.
- Huber, S.M., Lottspeich, F. & Kämper, J. (2002). A gene that encodes a product with similarity to dioxygenases is highly expressed in teliospores of *Ustilago maydis*. *Mol Genet Genomics*, 267: 757-71.
- Jensen, E.C., Ogg, C. & Nickerson, K.W. (1992). Lipoxygenase inhibitors shift the yeast/mycelium dimorphism in *Ceratocystis ulmi*. *Appl Environ Microbiol*, 58: 2505-8.
- Koeduka, T., Matsui, K., Akakabe, Y. & Kajiwara, T. (2002). Catalytic properties of rice  $\alpha$ -oxygenase. A comparison with mammalian prostaglandin H synthases. *J Biol Chem*, 277: 22648-55.
- Koshiishi, I., Tsuchida, K., Takajo, T. & Komatsu, M. (2005). Quantification of lipid alkyl radicals trapped with nitroxyl radical via HPLC with postcolumn thermal decomposition. *J Lipid Res*, 46: 2506-13.
- Koshiishi, I., Tsuchida, K., Takajo, T. & Komatsu, M. (2006). Radical scavenger can scavenge lipid allyl radicals complexed with lipoxygenase at lower oxygen content. *Biochem J*, 395: 303-309.
- Koshkin, V. & Dunford, H.B. (1999). Coupling of the peroxidase and cyclooxygenase reactions of prostaglandin H synthase. *Biochim Biophys Acta*, 1430: 341-8.
- Kuby, S.A. (1990). *A study of enzymes: Enzyme catalysis, kinetics, and substrate binding*, Boca Raton: CRC Press.
- Kulmacz, R.J. (1987). Prostaglandin-G2 Levels during Reaction of Prostaglandin-H Synthase with Arachidonic-Acid. *Prostaglandins*, 34: 225-240.
- Kuribayashi, T., Kaise, H., Uno, C., Hara, T., Hayakawa, T. & Joh, T. (2002). Purification and characterization of lipoxygenase from *Pleurotus ostreatus*. *J Agric Food Chem*, 50: 1247-53.
- Labeque, R. & Marnett, L.J. (1987). 10-Hydroperoxy-8,12-octadecadienoic acid. A diagnostic probe of alkoxyl radical generation in metal-hydroperoxide reactions. *J Am Chem Soc*, 109: 2828-2829.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-684.
- Laidler, K.J. & Bunting, P.S. (1973). *The Chemical Kinetics of Enzyme Action*, Oxford: Clarendon Press.
- Lamacka, M. & Sajbidor, J. (1998). The content of prostaglandins and their precursors in *Mortierella* and *Cunninghamella* species. *Lett Appl Microbiol*, 26: 224-6.

- Landino, L.M., Crews, B.C., Gierse, J.K., Hauser, S.D. & Marnett, L.J. (1997). Mutational analysis of the role of the distal histidine and glutamine residues of prostaglandin-endoperoxide synthase-2 in peroxidase catalysis, hydroperoxide reduction, and cyclooxygenase activation. *J Biol Chem*, 272: 21565-21574.
- Lau, S.-M., C., Harder, P.A. & O'keefe, D.P. (1993). Low carbon monoxide affinity allene oxide synthase is the predominant cytochrome P450 in many plant tissues. *Biochemistry*, 32: 1945-1950.
- Lee, D.-S., Nioche, P., Hamberg, M. & Raman, C.S. (2008). Structural insights into the evolutionary paths of oxylipin biosynthetic enzymes. *Nature*, 455: 363-368.
- Li, D.-C., Lui, Z.-W. & Lu, J. (2001). Purification and characterization of lipoxygenase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus*. *Mycol Res*, 105: 190-194.
- Liavonchanka, A. & Feussner, I. (2006). Lipoxygenases: Occurrence, functions and catalysis. *J Plant Physiol*, 163: 348-357.
- Lipscomb, J.D. (1980). Electron paramagnetic resonance detectable states of cytochrome P-450cam. *Biochemistry*, 19: 3590-9.
- Makris, T.M., Von Koenig, K., Schlichting, I. & Sligar, S.G. (2006). The status of high-valent metal oxo complexes in the P450 cytochromes. *J Inorg Biochem*, 100: 507-18.
- Marnett, L.J. (2008). Biochemistry - Divergence from the superfamily. *Nature*, 455: 300-301.
- Marnett, L.J., Rowlinson, S.W., Goodwin, D.C., Kalgutkar, A.S. & Lanzo, C.A. (1999). Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J Biol Chem*, 274: 22903-6.
- Matsuda, Y., Beppu, T. & Arima, K. (1978a). Circular dichroism of *Fusarium* lipoxygenase from *Fusarium oxysporum*. *Biochem Biophys Res Commun*, 85: 203-8.
- Matsuda, Y., Beppu, T. & Arima, K. (1978b). Crystallization and positional specificity of hydroperoxidation of *Fusarium* lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta*, 530: 439-50.
- Matsuda, Y., Beppu, T. & Arima, K. (1979). Spin-state exchange in fusarium lipoxygenase on binding of linoleic acid. *Biochem Biophys Res Commun*, 86: 319-24.
- Matsuda, Y., Satho, T., Beppu, T. & Arima, K. (1976). Purification and Properties of Co<sup>2+</sup> Requiring Heme Protein Having Lipoxygenase Activity from *Fusarium oxysporum*. *Agr Biol Chem*, 40: 963-976.
- Matsui, K. (2006). Green leaf volatiles: hydroperoxide lyase pathway of oxylipin metabolism. *Curr Opin Plant Biol*, 9: 274-280.
- Matsui, K., Sasahara, S., Akakabe, Y. & Kajiwar, T. (2003). Linoleic acid 10-hydroperoxide as an intermediate during formation of 1-octen-3-ol from linoleic acid in *Lentinus decadetes*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67: 2280-2.

- Mazur, P., Meyers, H.V., Nakanishi, K., El-Zayat, A.A.E. & Champe, S.P. (1990). Structural elucidation of sporogenic fatty acid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Tetrahedron Lett*, 31: 3837-3840.
- Mazur, P., Nakanishi, K., Elzayat, A.A.E. & Champe, S.P. (1991). Structure and synthesis of sporogenic Psi factors from *Aspergillus nidulans*. *J Chem Soc, Chem Commun*, 20: 1486-1487.
- Meunier, B., De Visser, S.P. & Shaik, S. (2004). Mechanism of oxidation reactions catalyzed by cytochrome P450 enzymes. *Chem Rev*, 104: 3947-80.
- Miles, J.S., Munro, A.W., Rospendowski, B.N., Smith, W.E., Mcknight, J. & Thomson, A.J. (1992). Domains of the catalytically self-sufficient cytochrome P450 BM-3. Genetic construction, overexpression, purification and spectroscopic characterization. *Biochem J*, 288 ( Pt 2): 503-9.
- Mizuno, K., Yamamoto, S. & Lands, W.E.M. (1982). Effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on fatty acid cyclooxygenase and prostaglandin hydroperoxidase activities. *Prostaglandins*, 23: 743-757.
- Montillet, J.-L., Chamnongpol, S., Rusterucci, C., Dat, J., Van De Cotte, B., Agnel, J.-P., Battesti, C., Inze, D., Van Breusegem, F. & Triantaphylides, C. (2005). Fatty acid hydroperoxides and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the execution of hypersensitive cell death in tobacco leaves. *Plant Physiol*, 138: 1516-1526.
- Mosblech, A., Feussner, I. & Heilmann, I. (2009). Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 511-517.
- Murphy, R.C. & Gijon, M.A. (2007). Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. *Biochem J*, 405: 379-95.
- Murray, J.J. & Brash, A.R. (1988). Rabbit reticulocyte lipoxygenase catalyzes specific 12(S) and 15(S) oxygenation of arachidonoyl-phosphatidylcholine. *Arch Biochem Biophys*, 265: 514-532.
- Neumann, H., Hazen, J.L., Weinstein, J., Mehl, R.A. & Chin, J.W. (2008). Genetically encoding protein oxidative damage. *J Am Chem Soc*, 130: 4028-33.
- Noordermeer, M.A., Veldink, G.A. & Vliegthart, J.F. (2001). Spectroscopic studies on the active site of hydroperoxide lyase; the influence of detergents on its conformation. *FEBS Lett*, 489: 229-32.
- Noren, C.J., Anthony-Cahill, S.J., Griffith, M.C. & Schultz, P.G. (1989). A general method for site-specific incorporation of unnatural amino acids into proteins. *Science*, 244: 182-8.
- Noverr, M.C., Erb-Downward, J.R. & Huffnagle, G.B. (2003). Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. *Clin Microbiol Rev*, 16: 517-33.
- Noverr, M.C., Phare, S.M., Toews, G.B., Coffey, M.J. & Huffnagle, G.B. (2001). Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. *Infect Immun*, 69: 2957-63.

- Noverr, M.C., Toews, G.B. & Huffnagle, G.B. (2002). Production of prostaglandins and leukotrienes by pathogenic fungi. *Infect Immun*, 70: 400-2.
- Oliw, E.H. (2002). Plant and fungal lipoxygenases. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68-69: 313-323.
- Oliw, E.H., Su, C. & Sahlin, M. (1999). Catalytic properties of linoleate diol synthase of the fungus *Gaeumannomyces graminis*: a comparison with PGH synthases. *Adv Exp Med Biol*, 469: 679-85.
- Oliw, E.H., Su, C., Skogstrom, T. & Benthin, G. (1998). Analysis of novel hydroperoxides and other metabolites of oleic, linoleic, and linolenic acids by liquid chromatography-mass spectrometry with ion trap MS<sup>n</sup>. *Lipids*, 33: 843-52.
- Omura, T. & Sato, R. (1964a). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*, 239: 2370-8.
- Omura, T. & Sato, R. (1964b). The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. II. Solubilization, purification, and properties. *J Biol Chem*, 239: 2379-85.
- Panicco, P., Astuti, Y., Fantuzzi, A., Durrant, J.R. & Gilardi, G. (2008). P450 versus P420: correlation between cyclic voltammetry and visible absorption spectroscopy of the immobilized heme domain of cytochrome P450 BM3. *J Phys Chem B*, 112: 14063-8.
- Perez-Gilabert, M., Sanchez-Felipe, I., Morte, A. & Garcia-Carmona, F. (2005). Kinetic properties of lipoxygenase from desert truffle (*Terfezia clavaryi* Chatin) ascocarps: effect of inhibitors and activators. *J Agric Food Chem*, 53: 6140-5.
- Rouzer, C.A. & Marnett, L.J. (2003). Mechanism of free radical oxygenation of polyunsaturated fatty acids by cyclooxygenases. *Chem Rev*, 103: 2239-304.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) *Proc Natl Acad Sci USA*, 74: 5463-5467.
- Sanz, A., Moreno, J.I. & Castresana, C. (1998). PIOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase. *Plant Cell*, 10: 1523-1537.
- Sasaki, M., Akahira, A., Oshiman, K., Tsuchido, T. & Matsumura, Y. (2005). Purification of cytochrome P450 and ferredoxin, involved in bisphenol A degradation, from *Sphingomonas* sp. strain AO1. *Appl Environ Microbiol*, 71: 8024-30.
- Scheiner, S. (2000). Calculation of isotope effects from first principles. *Biochim Biophys Acta*, 1458: 28-42.
- Schneider, C. & Brash, A.R. (2002). Lipoxygenase-catalyzed formation of R-configuration hydroperoxides. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators*, 68-69: 291-301.
- Schneider, C., Keeney, D.S., Boeglin, W.E. & Brash, A.R. (2001). Detection and cellular localization of 12R-lipoxygenase in human tonsils. *Arch Biochem Biophys*, 386: 268-74.
- Schneider, C., Pratt, D.A., Porter, N.A. & Brash, A.R. (2007). Control of oxygenation in lipoxygenase and cyclooxygenase catalysis. *Chem Biol*, 14: 473-488.

- Schneider, S. (2009). Charakterisierung der Psi-produzierenden Oxygenase C aus *Aspergillus nidulans*. Diplomarbeit, Georg-August-Universität, Abteilung Biochemie der Pflanze, Göttingen, Deutschland.
- Senger, T., Wichard, T., Kunze, S., Göbel, C., Lerchl, J., Pohnert, G. & Feussner, I. (2005). A multifunctional lipoxygenase with fatty acid hydroperoxide cleaving activity from the moss *Physcomitrella patens*. *J Biol Chem*, 280: 7588-7596.
- Shim, W.-B. & Dunkle, L.D. (2002). Identification of genes expressed during cercosporin biosynthesis in *Cercospora zea-maydis*. *Physiol Mol Plant Path*, 61: 237-248.
- Smith, W.L., Dewitt, D.L. & Garavito, R.M. (2000). Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem*, 69: 145-182.
- Smith, W.L. & Lands, W.E.M. (1972). Oxygenation of Polyunsaturated Fatty-Acids during Prostaglandin Biosynthesis by Sheep Vesicular Gland. *Biochemistry*, 11: 3276-&.
- Song, W.-C. & Brash, A.R. (1991). Purification of an allene oxide synthase and identification of the enzyme as a cytochrome P-450. *Science*, 253: 781-784.
- Stumpe, M., Carsjens, J.-G., Göbel, C. & Feussner, I. (2008). Divinyl ether synthesis in garlic bulbs. *J Exp Bot*, 59: 907-915.
- Stumpe, M. & Feussner, I. (2006). Formation of oxylipins by CYP74 enzymes. *Phytochem Rev*, 5: 347-357.
- Su, C., Brodowsky, I.D. & Oliw, E.H. (1995). Studies on linoleic acid 8R-dioxygenase and hydroperoxide isomerase of the fungus *Gaeumannomyces graminis*. *Lipids*, 30: 43-50.
- Su, C. & Oliw, E.H. (1996). Purification and characterization of linoleate 8-dioxygenase from the fungus *Gaeumannomyces graminis* as a novel hemoprotein. *J Biol Chem*, 271: 14112-14118.
- Su, C. & Oliw, E.H. (1998). Manganese lipoxygenase - Purification and characterization. *J Biol Chem*, 273: 13072-13079.
- Su, C., Sahlin, M. & Oliw, E.H. (1998). A protein radical and ferryl intermediates are generated by linoleate diol synthase, a ferric hemeprotein with dioxygenase and hydroperoxide isomerase activities. *J Biol Chem*, 273: 20744-20751.
- Su, C., Sahlin, M. & Oliw, E.H. (2000). Kinetics of manganese lipoxygenase with a catalytic mononuclear redox center. *J Biol Chem*, 275: 18830-18835.
- Takajo, T., Tsuchida, K., Murahashi, T., Ueno, K. & Koshiishi, I. (2007). Intramolecular rearrangement of linolenate peroxy radicals in lipoxygenase reactions at lower oxygen content. *J Lipid Res*, 48: 855-862.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 22: 4673-4680.
- Thuresson, E.D., Lakkides, K.M., Rieke, C.J., Sun, Y., Wingerd, B.A., Micielli, R., Mulichak, A.M., Malkowski, M.G., Garavito, R.M. & Smith, W.L. (2001). Prostaglandin endoperoxide H

- synthase-1 - The functions of cyclooxygenase active site residues in the binding, positioning, and oxygenation of arachidonic acid. *J Biol Chem*, 276: 10347-10357.
- Tsai, A., Hsi, L.C., Kulmacz, R.J., Palmer, G. & Smith, W.L. (1994). Characterization of the tyrosyl radicals in ovine prostaglandin H synthase-1 by isotope replacement and site-directed mutagenesis. *J Biol Chem*, 269: 5085-91.
- Tsai, A.L., Kulmacz, R.J., Wang, J.S., Wang, Y., Van Wart, H.E. & Palmer, G. (1993). Heme coordination of prostaglandin H synthase. *J Biol Chem*, 268: 8554-63.
- Tsitsigiannis, D.I., Kowieski, T.M., Zarnowski, R. & Keller, N.P. (2004a). Endogenous lipogenic regulators of spore balance in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic Cell*, 3: 1398-1411.
- Tsitsigiannis, D.I., Zarnowski, R. & Keller, N.P. (2004b). The lipid body protein, PpoA, coordinates sexual and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem*, 279: 11344-11353.
- Tsitsigiannis, D.I., Bok, J.W., Andes, D., Nielsen, K.F., Frisvad, J.C. & Keller, N.P. (2005a). *Aspergillus* cyclooxygenase-like enzymes are associated with prostaglandin production and virulence. *Infect Immun*, 73: 4548-59.
- Tsitsigiannis, D.I., Kowieski, T.M., Zarnowski, R. & Keller, N.P. (2005b). Three putative oxylipin biosynthetic genes integrate sexual and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Microbiol*, 151: 1809-1821.
- Tsitsigiannis, D.I. & Keller, N.P. (2007). Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends Microbiol*, 15: 109-118.
- Wada, M., Yokoyama, C., Hatae, T., Shimonishi, M., Nakamura, M., Imai, Y., Ullrich, V. & Tanabe, T. (2004). Purification and characterization of recombinant human prostacyclin synthase. *J Biochem*, 135: 455-63.
- Wang, X., Devaiah, S.P., Zhang, W. & Welti, R. (2006). Signaling functions of phosphatidic acid. *Prog Lipid Res*, 45: 250-278.
- Wasternack, C. (2007). Jasmonates: An update on biosynthesis, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. *Ann Bot*, 100: 681-697.
- Welinder, K.G. (1992). Superfamily of plant, fungal, and bacterial peroxidases. *Curr Opin Struct Biol*, 2: 388-393.
- Wichard, T., Göbel, C., Feussner, I. & Pohnert, G. (2005). Unprecedented lipoxygenase/hydroperoxide lyase pathways in the moss *Physcomitrella patens*. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44: 158-161.
- Wurzenberger, M. & Grosch, W. (1984a). The formation of 1-octen-3-ol from the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid by a hydroperoxide lyase in mushrooms (*Psalliota bispora*). *Biochem Biophys Acta*, 794: 25-30.
- Wurzenberger, M. & Grosch, W. (1984b). Origin of the oxygen in the products of the enzymatic cleavage reaction of linoleic acid to 1-octen-3-ol and 10-oxo-trans-8-decenoic acid in mushrooms (*Psalliota bispora*). *Biochem Biophys Acta*, 794: 18-24.

- Wurzenberger, M. & Grosch, W. (1984c). Stereochemistry of the cleavage of the 10-hydroperoxide isomer of linoleic acid to 1-octen-3-ol by a hydroperoxide lyase from mushrooms (*Psalliota bispora*). *Biochem Biophys Acta*, 795: 163-165.
- Xue, H., Chen, X. & Li, G. (2007). Involvement of phospholipid signaling in plant growth and hormone effects. *Curr Opin Plant Biol*, 10: 483-489.
- Yeh, H.C., Hsu, P.Y., Wang, J.S., Tsai, A.L. & Wang, L.H. (2005). Characterization of heme environment and mechanism of peroxide bond cleavage in human prostacyclin synthase. *Biochim Biophys Acta*, 1738: 121-32.
- Yonetani, T. & Anni, H. (1987). Yeast cytochrome c peroxidase. Coordination and spin states of heme prosthetic group. *J Biol Chem*, 262: 9547-54.
- Yoshioka, S., Takahashi, S., Hori, H., Ishimori, K. & Morishima, I. (2001). Proximal cysteine residue is essential for the enzymatic activities of cytochrome P450cam. *Eur J Biochem*, 268: 252-9.
- Zamocky, M., Jakopitsch, C., Furtmuller, P.G., Dunand, C. & Obinger, C. (2008). The peroxidase-cyclooxygenase superfamily: Reconstructed evolution of critical enzymes of the innate immune system. *Proteins*, 72: 589-605.

## 7. Abbildungsverzeichnis

- Abb.1. Mechanismus der Reaktion einer 9S-LOX bzw. 13S-LOX mit  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$ .
- Abb.2. Überblick über die Oxylin-Biosynthese in Pflanzen.
- Abb.3. Detaillierter Mechanismus der Reaktion der PGHS mit  $20:4^{\Delta 5Z,8Z,11Z,14Z}$ .
- Abb.4. *Branched chain*-Mechanismus der PGHS am Beispiel der Reaktion der *O. aries* PGHS-1 mit  $20:4^{\Delta 5Z,8Z,11Z,14Z}$ .
- Abb.5. Überblick über die Prostanoid- und Leukotrien-Biosynthese in Säugetieren.
- Abb.6. Reaktionsmechanismus der MnLOX aus *G. graminis*.
- Abb.7. Reaktionsmechanismus der 7,8-LDS aus *G. graminis*.
- Abb.8. Klassifizierung der von  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  abgeleiteten Oxyline ( $\text{psia}$ ) hinsichtlich der Anzahl und der Positionierung der Hydroxy-Gruppen am Fettsäurerückgrat.
- Abb.9. Partieller Aminosäuresequenzvergleich von PpoA und PpoC.
- Abb.10. Reinigung von rekombinantem PpoA-Protein.
- Abb.11. Spektrale Analyse von PpoA.
- Abb.12. ESR-Spektrum von 250  $\mu\text{M}$  PpoA in HEPES-Puffer (50 mM, pH 7,4).
- Abb.13. Radio-HPLC- und CP-HPLC-Analyse der bei der Umsetzung von  $[1-^{14}\text{C}]-18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  bzw.  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  durch PpoA gebildeten Produkte.
- Abb.14. EI-MS-Spektren sowie die möglichen Fragmentenmuster der Methylsilylether-Methylester-Derivate von 5,8-DiHODE und 8R-HODE.
- Abb.15. RP-HPLC/MS<sup>2</sup>-Analyse der bei der Umsetzung von  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  durch PpoA gebildeten Produkte.
- Abb.16. Massenspektrometrische Analyse der unter  $^{18}\text{O}_2$ -Atmosphäre durch Inkubation von  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  mit PpoA gebildeten Produkte.
- Abb.17. Radio-HPLC-Analyse der Produkte nach Inkubation von  $[1-^{14}\text{C}]-8\text{R-HPODE}$  mit PpoA.
- Abb.18. RP-HPLC/MS<sup>2</sup>-Analyse der EAS-Nebenaktivität von PpoA.
- Abb.19. RP-HPLC/MS-Analyse der  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$ -Cm $\Delta$ P-Addukte.
- Abb.20. Darstellung des pH-Optimums von PpoA-Aktivität mit  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$ .
- Abb.21. Kinetische Analyse der Reaktion von PpoA mit  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode.
- Abb.22. Kolorimetrischer Peroxidase-Test.

- Abb.23. Analyse der von PpoA\_WT, PpoA\_Y374F, PpoA\_H1004A bzw. PpoA\_C1006A mit  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  gebildeten Produkte.
- Abb.24. RP-HPLC Analyse der von 8R-HPODE und PpoA\_WT bzw. PpoA\_Y374F gebildeten Produkte.
- Abb.25. Kinetische Analyse der Reaktion von PpoA\_H1004A und  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  mit Hilfe einer Sauerstoffelektrode.
- Abb.26. SDS-PAGE von gereinigtem PpoA\_Y374F und PpoA\_H1004A und spektrale Analyse beider Varianten und von PpoA\_WT.
- Abb.27. ESR-Spektren von PpoA\_Y374F und PpoA\_H1004A im Vergleich zu PpoA\_WT.
- Abb.28. Analyse der durch PpoA\_WT, PpoA\_V328A bzw. PpoA\_V328L gebildeten relativen Mengen an 8R-HODE.
- Abb.29. ESR-Spektren von PpoA nach der Inkubation mit  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  bzw. 8R-HPODE.
- Abb.30. Tandem-MS-Spektren der aus  $18:1^{\Delta 9Z}$  bzw. 8-[D<sub>2</sub>]- $18:1^{\Delta 9Z}$  von PpoA gebildeten Produkte.
- Abb.31. Auftragung der aus dem initialen Sauerstoffverbrauch errechneten Wechselzahl  $k_{cat}$  in Abhängigkeit von der eingesetzten Substratkonzentration.
- Abb.32. RP-HPLC/MS<sup>2</sup>-Analyse der bei der Umsetzung von  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  durch PpoC gebildeten Produkte.
- Abb.33. RP-HPLC/MS<sup>2</sup> Analyse der von  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  und PpoC gebildeten Produkte.
- Abb.34. Massenspektrometrische Analyse des durch  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$  und PpoC unter <sup>18</sup>O<sub>2</sub>-Atmosphäre gebildeten Epoxyalkohols.
- Abb.35. RP-HPLC/MS<sup>2</sup>-Analyse der Inkubationen von Zellextrakt PpoC-exprimierender Zellen mit 10-HPODE bzw. 8R-HPODE.
- Abb.36. Analyse der durch PpoC\_WT, PpoC\_L385A bzw. PpoC\_L385V gebildeten relativen Mengen an 8R-HODE.
- Abb.37. Hypothetischer Katalyse-Mechanismus für die Reaktion von PpoA mit  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$ .
- Abb.38. Einfluss der Aminosäuren auf die bevorzugte Oxidationsposition am Fettsäurerückgrat.
- Abb.39. Die Synthese von Oxylipinen in *A. nidulans* am Beispiel der Reaktion mit  $18:2^{\Delta 9Z,12Z}$ .

## 8. Tabellenverzeichnis

Tab.1: Verwendete Organismen und Stämme.

Tab.2a: Klonierungsvektor.

Tab.2b: Expressionsvektoren.

Tab.3: Reinigung von rekombinantem PpoA-Protein.

Tab.4: Produkte der Reaktion von PpoA mit verschiedenen ungesättigten Fettsäuren.

Tab.5: Kinetische Parameter für die Reaktion von PpoA mit verschiedenen ungesättigten Fettsäuren.

Tab.6: Produkte der Reaktion von PpoC mit verschiedenen ungesättigten Fettsäuren.

Tab.7: Kinetische Parameter für die Reaktion von PpoC mit verschiedenen Fettsäuren.

Tab.8: Vergleich der für PpoA ermittelten  $g$ -Faktoren mit denen anderer Enzyme.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

° C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AOS	Allenoxid-Synthase
BSTFA	N,O-Bis-silyl-trifluoracetamid
Bp	Basenpaar
Bzw.	Beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	zirka
CD	Circulardichroismus
CmΔP	3-Carbamoyl-2,2,5,5-tetramethyl-3-pyrrolin-N-oxyl
COX	Cyclooxygenase
CP	<i>chiral phase</i>
d	Tag
ddH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DiHHME	Dihydroxyhexadecensäure
DiHODE	Dihydroxyoctadecadiensäure
DiHOME	Dihydroxyoctadecensäure
DiHOTE	Dihydroxyoctadecatriensäure
DNA	Desoxyrionukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleinphosphat
DOX	Dioxygenase
<i>E</i>	<i>tans</i> -Konfiguration
EAS	Epoxyalkohol-Syntase
<i>et al.</i>	und andere
EI	Electron impact
ESR	Elektron-Spin-Resonanz
evtl.	eventuell
g	Gramm
GST	Glutathion-S-transferase
h	Stunde
HAc	Essigsäure
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

H(P)HME	Hydro(pero)xyhexadecensäure
H(P)ODE	Hydro(pero)xyoctadecadiensäure
H(P)OME	Hydro(pero)xyoctadecensäure
H(P)OTE	Hydro(pero)xyoctadecatriensäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
KIE	kinetischer Isotopie-Effekt
L	Liter
LC	liquid-chromatography
LDS	Linoleat-Diol-Synthase
LTX <sub>4</sub>	Leukotrien-X <sub>4</sub> (X = A,B,C,D,E)
LTXS	Leukotrien-X <sub>4</sub> -Synthase (X = A,B,C,D,E)
Log	dekadischer Logarithmus
LOX	Lipoxygenase
$\lambda$	Wellenlänge
M	Mol pro Liter
mA	Milliampere
MAG	Monoacylglycerin
Mbp	Maltose bindendes Protein
mg	Milligramm
min	Minute
mL	Milliliter
mM	Milimol pro Liter
MW	Molekulargewicht ( <i>molecular weight</i> )
<i>m/z</i> -Quotient	Masse/Ladungs-Quotient
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ L	Mikroliter
$\mu$ M	Mikromol pro Liter
NADH	Nikotinsäureamid-adenin-dinukleotid
NADPH	Nikotinsäuramid-adenin-dinukleotid-phosphat
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol pro Liter
NaP <sub>i</sub>	Natriumphosphat
ODA	10-Oxo-8-decensäure
OD <sub>X</sub>	optische Dichte bei der Wellenlänge von X nm

PAGE	Polyacrylamid-Gel-Electrophore
PGX <sub>2</sub> ,	Prostaglandin-X <sub>2</sub> (X = E,F,G,H,I)
PGHS	Prostaglandin-X <sub>2</sub> -Synthase (X = E,F,G,H,I)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	negative dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Ppo	<i>psi producing oxygenase</i>
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
Psi	precocious sexual inducer
Radio-HPLC	HPLC mit Szintillationsdetektor
RP-HPLC	<i>reversed phase</i>
rpm	<i>rotations per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
[S]	Substratkonzentration
s	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SP	<i>staight phase</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TMPD	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyl-p-phenylenediamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TXAS	Thromboxan-A <sub>2</sub> -Synthase
U	<i>unit</i> (Einheit der Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	Reaktionsgeschwindigkeit
vis	<i>visible</i>
V <sub>max</sub>	maximale Reaktionsgeschwindigkeit
vgl.	vergleiche
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumen pro Volumen)
w/v	<i>weight per volume</i> (Masse pro Volumen)
Y x g	Produkt aus Y und Schwerebeschleunigung
Z	<i>cis</i> -Konfiguration
z. B.	zum Beispiel

**Aminosäuren**

A	Alanin	L	Leucin
R	Arginin	K	Lysin
N	Asparagin	M	Methionin
D	Asparaginsäure	F	Phenylalanin
C	Cystein	P	Prolin
Q	Glutamin	S	Serin
E	Glutaminsäure	T	Threonin
G	Glycin	W	Tryptophan
H	Histidin	Y	Tyrosin
I	Isoleucin	V	Valin

Fettsäuren werden im Text in Zahlenform abgekürzt. Dabei wird die Anzahl der Kohlenstoffatome in der Fettsäure durch die Zahl vor dem Doppelpunkt und die Zahl der Doppelbindung durch die Zahl nach dem Doppelpunkt angegeben. So steht z. B. 18:2<sup>A9Z,12Z</sup> für Linolsäure. Die Position der Doppelbindung wird durch die hochgestellten Zahlen wiedergegeben. Erfolgt die Bestimmung vom Carboxylende der Fettsäure, so steht ein  $\Delta$  vor den Zahlen.

# 10. Anhang

## 10.1 cDNA und abgeleitete Proteinsequenzen von PpoA und PpoC

### 10.1.1 PpoA (Accessionnr.:AY502073)

atgggtgaagacaaagaacaaatcctcgccggcctcggaacaccatttcccaagtagaaaacgt  
 tgttgccgcatcggttacgaccttgccaacggcaacgggtgatggaacctacgttgccgaatccactc  
 agacgggcttagccaaagatctgagccatgtcgacctcaaggatgtccgcacactcgccgaagtcgctc  
 aagagtgcggctacgggagagccggttgatgacaagcagtatatcatggaaagagtgattcagttagc  
 tgctggcttaccatcgacatctcgcaacgctgcagagctaaccaagtcatttttgaacatgctgtgga  
 atgacttggaacatccaccagtttcttatctaggagctgattctatgcaccgcaaagccgacggctcg  
 ggtaataatcgtttctggcctcaacttggcgctgctggtagcgctacgcaagatctgttcggcccaa  
 gacgatgcagctcctccctgcccgatcctgagactattttcgattgcctgctccgcccgaagagt  
 acagggagcatcctaataagatatcaagcgttctattctacctcgcttcaatcattattcatgaccta  
 ttccagacagaccctaaagataattccgtgtccaagacatcgtcataatttgacctctcacctttgta  
 tggcaataatcaagacgagcagaaccttgttcgtacgttcaaggatggaaagcttaagccagattggt  
 tcgctaccaagcgagtgttgggcttctcctccggcgctcggcgcttctactgatcatgttcaaccgcttc  
 cacaactatgtggttgatcaattggcggcgatcaacgaatgcggccgattcaccaaacctgacgagtc  
 caacgttgatgagatgctaaatacgataacaatctcttccaaaccgggcgactgggtgactgtgggt  
 tgtacgcaaatattatcctaaaagattatgtccgaacgattttgaaataaaaccggacagatagcacc  
 tggagtgtgaccccagaatggaaatgaaggatggtttattaggtgaagcagcagcaatggcaaccgg  
 gaaccaggtgtcagccgaatttaatgtcgtgtaccgggtggcagccttgcatctccaagcgcgatgaaa  
 aatggacagaggattttcacctgaaatcatgcccggagtggtccaagcacactatcgatgcaagat  
 tttgtcgcgggtcttgacgggtggcaggactcccacaagagccacttgagcgcacctctctgg  
 cttacagcgaagccggacgggtgattcaacgacgatgacctggttaatctggttgagaagagtgttg  
 aagactgcgcaggtgcatttgggtgcgtctcacgttccagccatcttcaagagcgttgaagctctcgg  
 ataatgcaggctcggagatggaacttgggaacgctcaatgagttccgccaatatttcaatctggctcc  
 tcataagacctttgaggatatcaactccgatccgtacattgacggatcagctcaagcgcactgtatgatc  
 atccagatcttgtggagatttaccctgggtgttgtgtggaagaagccaaagactccatggctccctgga  
 agcggcctttgcacgaacttcaactatccagggaatcctttcggatgcgggtggcattgggttcgcyg  
 tgatagattttactgctgactacactccgaagcaccttacgaattgggctacaacgagattcagc  
 ctaacaacgcgctcgatcaaggtcaggtattctacaagctggttcttcgcygacttcccaaaccatttt  
 gatggaaattctatctatgctcatttcccccttgctgcttccctcggaaaatgagaaaatattgaagag  
 ccttgggggttgcgagaagtatagctgggaaaagccagtcgtatctctcatccgattttcatcagct  
 ctcatgcccgcgtgcatgtccatcctcgaaaatcaagaaacggttcaagggtgacttggggtaggaagatt  
 gagttccttatgcaacgcgataagcacaatacgggaaggacttcatgctgctgagacccggccacc  
 caacgctgcatcgcgcaagatgatgggttccgccttgatcgcgatgaatgggaggctgaggtcaaaa  
 acttctacgagcaaaactctaaaactcttgcataagaactcctacaaacttgcgggcgtaaccaa  
 gtcgatatcgttcgtgatgtggccaatctcgccaagtccacttctgctctagcgtcttctcattgccc  
 actgaaaacagactctaactcctaggggtatcttcgcagagtcggaactgtacaagataatggctgcag  
 ttttcaactgccatcttctacgacgcagatattgggaaatcgttcagagctaaaccaggccgcccgtact  
 gtaacgcagcagctgggcccagcctaactatggccaacgtcgagatcatagccaaaaccggcttgatcgc  
 taacctcgtgaaccgcttccaccggcgcgacgtgcttagcgaatatggcatccatgatccagcgtc  
 tactggatagtggtctcccagcgcagagattgtatggactcatatccttccctacggccgggtggaatg  
 gtggcaaccaagcacaactgttttcgcaatgtctggactattatctctcggaagagggtctgtggca  
 tcttctgagatcaaccgactggccaaggaaaataccccggaagctgatgagctacttacacgctatt  
 tcatggaagggtgctcggctacggctcatccgttgccctgacctcgagtagctgcygaccccaggtcgta  
 gaagacaatggcgaaaaactcaccatcaaagctggccaggctgttatgtgtaacctgggtctctgcyg  
 catggatcctactgcctttccagatccagagaagggtcaaaactgaccgtgacatgaacttatacggcc

actttggctttgggccccacaagtgtttgggcttagacctatgcaagacagggctgagcagcatgcta  
 aaagtacttggacgcttggacaatctccgtcgtgctcctggagcgcagggacagttgaagaagctttc  
 tggacctggcgggatcgctaagtatatgaatgaggatcaaagcggcttcactcccttcccgtcaacta  
 tgaagatccaatgggacggcgaattgccccaaactgaaggaagatttttaa

MGEDKETNILAGLGNTISQVENVVAASLRPLPTATGDGTYVAESTQTGLAKDLSHVDLKDVRTLAEEV  
 KSAATGEPVDDKQYIMERVIQLAAGLPSTSRNAAELTKSFLNMLWNDLEHPPVSYLGADSMHRKADGS  
 GNNRFWPQLGAAGSAYARSVRPKTMQSPSLPDPETIFDCLLRKEYREHPNKISSVLFYLASIIHDL  
 FQTDPKDNSVSKTSSYLDLSPLYGNNQDEQNLVRTFKDGKLPDCFATKRVLGFPPGVGVLLIMFNRF  
 HNYVVDQLAAINECGRFTKPEDESNVDEYAKYDNNLFQTGRLVTCGLYANIIKDYVRTIILNINRTDST  
 WSLDPRMEMKDGLLGEAAAMATGNQVSAEFNVVYRWHACISKRDEKWTEDFHREIMPGVDPSTLSMQD  
 FVAGLGRWQAGLPQEPLERPFSGLQRKPDGAFNDDDLVNLFEKSVEDCAGAFGASHVPAIFKSVEALG  
 IMQARRWNLGTLNEFRQYFNLAPHKTFEDINSDPYIADQLKRLYDHPDLVEIYPGVVVEEAKDSMVP  
 SGLCTNFTISRAILSDAVALVRGDRFYTVDYTPKHLTNWAYNEIQPNNAVDQGVFYKLVLRAFP  
 NHF DGNSIYAHFPLVVPSENEKILKSLGVAEKYSWEKPSRISHPIFISSHAACMSILENQETF  
 KVTWGRKIEFLMQRDKHQYKDFMLSGDRPPNAASRKMMGSALYRDEWEAEVKNFYEQTTLKL  
 LHKNSYKLAGVNQVDIVRDVANLAQVHFCSSVFSPLKTDNPRGIFAESELYKIMAAVFTAIF  
 YDADIGKSFELNQAARTVTQQLGQLTMANVEIIAKTGLIANLVNRLHRRDVLSEYGIHMIQRLL  
 DSGLPATEIVWTHILPTAGGMVANQAQLFSQCLDYYLSEEGSGHLPEINRLAKENTPEADELL  
 TRYFMEGARLRSSVALPRVAAQPTVVEDNGEKLTIKAGQVVMCNLVSACMDPTAFDPDEKVKLDR  
 DMNLYAHFGFGPHKCLGLDLCKTGLSTMLKVLGRDLNLRRAPGAQGQLKKLKLSGPGGI  
 AKYMNEQSGFTFPSTMKIQWDGELPQLKEDF

**10.1.2 PpoC (Accessionnr.: AY613780)**

atggttgcgaagattttctaccttcagaaagtccaagggggacaagaccgagaaggccgaccgcatc  
taaggccaatggctccaatgccaatagcgcgctgctggccagcaacagcagcaagcgcagtcacaag  
tgccctctccgcgagggccctcttcagacagcgggagcagcgtgagagtgaagacgtcccgcgtgc  
tttgagaaatacgcgcaggtgcttcatgcctcctctcgcccaatccccaccagggcgagaggcagc  
atatctcgagaaggagcacccttcaggcttgttcaatgatctgaaatctctcggtttcaaggactttg  
cctcattgaaggacgtgatcaagaccaagatcaatggcgagctcacggatgacaagaccatgatcatg  
gagcgcattcagatcggttagcagccttccctcaaacctcgaagatgctgctggacctcacgaacat  
gttccctcgacgagctctgggggttctttgcctcaccctccgctctcatatatgggcaacgactaccagt  
accgctctgctgatggttctaacaacaacccactcttccatggcttgggtgccgctaacacagcttac  
gcacgctccattgagcccttgaccgtgcaaccggcggtcttccggacgctggtttggctcttgatac  
tttggttgcgcgccagaagtttacgcctcatccaataaggtgtctagtcttttcttcgactggcggt  
ctctgatcattcagatcttccaaccgactacagagattataataagaacaagacctcggcttac  
ctcgatcttgccattctctacgggtgacgtacaggaagaacaggacctggtccgactcacaaggacgg  
aaagctgaagccagactccttctccgagccgagctgcaggcttccccgcagcttgctgcttcttc  
tcggtatgctaaacaggttccacaactatggtttagaagagcttgctgcatcaacgagaacggctgc  
ttcactaaaccagccctgatctccccgaagagcaagcaagaaggcctgggctaagtacgatgagga  
tcttttccagaccggacgactcattacctgcggtctgttattaacatcacctgtacgattaccttc  
gcacgatcgtcaacctgaaccgagtgaaacagcactggtgcttggacctcgagctcagatggaaggc  
agcgtacacctgcccgtctcgaaaccaatgttctgctgagtttaacctggcctaccggtggcactc  
tgctatcagtgccaacgacgagaaatggaccgagaaggtctacgaggaactgatcggcaagcctggtt  
cggagatcagcacgcaggagctgcttatgggtcttggcaagtacgggtgctagccttcccaagatcca  
tctcagcgcaccttgcgggacttaagcgtcaagaagatggtacctttaaggatgaggagctagtcaa  
tatcctgacttccgccattgaggatggtgctggttcgtttgggtgctcgaatgtgcccaggctcctca  
aggccggtgaggttctcggtatcgagcagggccgcaagtggaaacgttggatctcttaacgagttccga  
aagttcttcgggttgaagaattacgagaccttcgaggagatcaactccgacctgaggtcgccgagtc  
acttcgagctttgtacgggtcaccctgactacgtcgagctgtaccaggtattgtctctgaggaggcca  
aggaacctatgatccccggcgtcggcatcgcccctacttataccatctcccgcggttctgtccgat  
gcggttgctgctcgtgctgctgacagacactaactgtcgactacaacccccgcaacctgaccaactg  
gggttacaacgaggtccgctacgatcttaacatcaaccaaggctgtgtcttttacaagctcgccactc  
gcgcttccccaaactggttcaaaccgactctatctacgccactacctatgaccattcccagcgag  
aacaaggtcatcatgaagaatctcggccgagaggctgattactcctgggaccggccgagcagcaccg  
tccctcgctagcttgacctcctactctaatgtcaagctcattcttgaccagcagaaggacttccgtg  
tgggtctggggcgactgcaactccgctcactctggcaagggcgcggaagacttctggagcaagacgta  
agtgacctcagttcaagaagagcatcaaggagttctacgagaaaacgactctggagcttttcgcgga  
caagtcggtcaacctagccggaaggaagcaaatgacattgtcaaagacgttggcaacatcgtgcccg  
ctcgatttgctcgaagcttctctctctcctctgaggagcaaggagaactccaagggcgctctcacc  
gaccacgagatthttcatggctttggctgtgattataatgccatctttttcgacgttgacaccacaaa  
gtcattccctcttcgcaaagctgcagacgctgtttccaaggaactcggcaagcagctcgagagccacg  
tcaagtcctcagctctccaggcttcttccagagtcattgacaacttccgtgatgaccacaacgct  
ctcaaggatcttgggtgaccagctcattaagcgttggcagaggggtggtctcagcgtctcggacatcac  
ctacggccagatcctgccgacagctgtggaactggtccacggccaggctcagatggttcaaccgagttg  
ttgagtaactatctcaacgagggcaagcagcactacctgagcttagcctccttgccaagcaggactct  
gccgagacggatgcaagctgacccgctacgctctggaggctattcgctgaatgccggctcgggagc  
ttaccgcaaggccgagaccaacttctatthtcaaggagggggacgcagatatcaacctcaaacctgggg  
acgagatcttcatcagctcgacccaagcaaacctgacccaacggccttccctgacctgatgaagtg  
cgccttgaccgacccgatgagtcctacctcaactacggcatcggttctcaaatcggcctcggcaagga  
cgccacactgaccgagtcactgccatggtacgcgcgccttcagcttggagggtctccgtcgggtc  
ctgggtgacagggagtcctgaagaaggttgtccgcccgaaggctacacctctacatgcgggagac  
cacgggtgctttttcgcttccccgacgacttccgtgtgcaactcgaacggagaagttgtcactcctaa  
gaagcagattgattctgcttga

MLRRFSTFRKSKGDKTEKADRDSKANGSNANSAAAASNSSKRQSKVPPRRPSSDSGSSAESEDPVAV  
 FEKYAQVLHASSRPIPHQGGEAAYLEKEHPSGLFNDLKSLGFKDFASLKDVIKTKINGELTDDKTMIM  
 ERIIQIVSSLPSNSKMRVDLTMFLDELWGLPHPLSYMGNDYQYRSADGSNNNPTLPWLGAAANTAY  
 ARSIEPLTVQPGGLPDAGLVFDTLFARQKFTPHPNKVSSLFDFWASLIHDIHQTDYRDYNKNKTSAY  
 LDLAAILYGDVQEEQDLVRTHKDGKLPDSFSEPRLOAFPAACCVLLVMLNRFHNYVVEELAAINENGR  
 FTKPSPDLPEEQAKKAWAKYDEDLFQTGRLITCGLFINITLYDYLRITIVNLNRVNSTWCLDPRAQMEG  
 SATPAGLGNQCSVEFNLAYRWHSASANDEKWTEKVYEELIGKPGSEISTQELLMGLGKYGASLPKDP  
 SQRTFAGLKRQEDGTFKDEELVNILTSAIEDVAGSFGARNVPKVLKAVEVLGIEQGRKWNVGSLSNEFR  
 KFFGLKNYETFEEINSDPEVAESLRALYGHDPDYVELYPGIVSEEAKEPMIPGVGIAPTYTISRVLSD  
 AVALVRGDRHYTVDYNPRNLTNWGYNEVRYDLNINQGCVFYKLATRAFPNWFKPDSIYAHYPMTIPSE  
 NKVIMKNLREADYSWDRPQYQAPRASLTSYSNVKLILDQQKDFRVVWGDCPTLHSGKGGEDFWSKTL  
 SDPQFKKSIKEFYEKTLELFAADKSVNLAGRKQIDIVKDVGNIVPARFASKLLSLPLRSKENSXKGVFT  
 DHEIFMALAVIYNAIFFDVDTTKSFPLRKAADAVSKELGKHVESHVKS SVSSPGFLSRVIDNFRDDHNA  
 LKDLGDQLIKRLAEGGLSVSDITYGQILPTAVELVHGQAQMFTRVVEYYLNEGKQHLPELSLLAKQDS  
 AETDAKLTRYALEAIRLNAGSGAYRKAETNFYFKEGDADINLKPGEIFISSTQANRDPTAFDPDDEV  
 RLDRPDES YLNYGIGSQIGLGDATLTAVTAMVRAAFSLEGLRPAPGVQGVLLKVVVRPEGYTLYMRED  
 HGAFSPFPTTFRVHFDGEVVTTPKKQIDSA

## **10.2 Primer**

### **10.2.1 Klonierungs-Primer**

PpoC\_NdeIa

5'-CCATATGTTGCGAAGATTTTCTACCTTCAG-3',

PpoC\_NotIb

5'-AGCGGCCGCTCAAGCAGAATCAATCTGCTTCTTAG-3'

### **10.2.2 Mutagenese-Primer**

#### **PpoA**

PpoA\_C1006Aa

5'-GGCTTTGGGCCCCACAAGGCCTTGGGCTTAGACCTATG-3'

PpoA\_C1006Ab

5'-CATAGGTCTAAGCCCAAGGCCTTGTGGGGCCCAAAGCC-3'

PpoA\_H1004Aa

5'-CACTTTGGCTTTGGGCCTGCCAAGTGTGGGCTTAG-3'

PpoA\_H1004Ab

5'-CTAAGCCCAAACACTTGGCAGGCCCAAAGCCAAAGTG-3'

PpoA\_Y374Fa

5'-CAGGTGTCAGCCGAATTCAATGTCGTGTTCCGGTGGCACGCTTGC-3'

PpoA\_Y374Fb

5'-GCAAGCGTGCCACCGGAACACGACATTGAATTCGGCTGACACCTGG-3'

PpoA\_V328La

5'-CAAATATTATCCTAAAAGATTATCTACGTACGATTTTGAATATAAAC-3'

PpoA\_V328Lb

5'-GTTTATATTCAAATCGTACGTAGATAATCTTTTAGGATAATATTTG-3'

PpoA\_V328Aa

5'-GTACGCAAATATTATCCTTAAGGATTATGCACGAACGATTTTGAATATAAA-3'

PpoA\_V328A

5'-GTTTATATTCAAATCGTTCGTGCATAATCCTTAAGGATAATATTTGCGTAC-3'

**PpoC**

PpoC\_Y427Fa

5'-GAAACCAATGTTCTGTCGAATTTAACCTGGCCTTTCGGTGGCACTCTGCTATCAGTG-3'

PpoC\_Y427Fb

5'-CACTGATAGCAGAGTGCCACCGAAAGGCCAGGTTAAATTCGACAGAACATTGGTTTC-  
3'

PpoC\_G1039Ca

5'-GGCATCGGTTCTCAAATCTGCCTAGGCAAGGACGCCACACTG-3'

PpoC\_G1039Cb

5'-CAGTGTGGCGTCCTTGCCTAGGCAGATTTGAGAACCGATGCC-3'

PpoC\_L385Va

5'-CATCACCTGTACGATTACGTACGCACGATCGTTAACCTGAACCGAGTGAACAG-3'

PpoC\_L385Vb

5'-CTGTTCACTCGGTTTCAGGTTAACGATCGTGCGTACGTAATCGTACAGGGTGATG-3'

PpoC\_L385Aa

5'-CATCACCTGTACGATTACGCACGCACGATCGTTAACCTGAACCGAGTGAACAG-3')

PpoC\_L385Ab

5'-CTGTTCACTCGGTTTCAGGTTAACGATCGTGCGTACGTAATCGTACAGGGTGATG-3')

# Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz herzlich bei all denen bedanken, die bei der Entstehung dieser Arbeit geholfen und mich während dieser Zeit tatkräftig unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. Ivo Feußner möchte ich ganz besonders für das Überlassen der Arbeit, die Betreuung und die Unterstützung, die zahlreichen interessanten und netten Diskussionen und die stete Bereitschaft meine Fragen zu beantworten danken. Ich möchte mich auch dafür bedanken, dass er es mir ermöglicht hat, an so vielen verschiedenen Tagungen und Kongressen teilnehmen zu können.

Bei Dr. Ellen Hornung bedanke ich mich für die stete Unterstützung bei molekularbiologischen Fragestellungen, die guten Diskussionen, die gute Laune im Laboralltag, die aufbauenden und motivierenden Worte, wenn mal wieder etwas schief lief und natürlich für die zahlreichen leckeren Mittagessen.

Herrn Prof. Dr. Oliver Einsle danke ich für die Kollaboration, die aufschlussreichen netten Diskussionen, die Hilfe beim Kristallisieren und Testen von Proteinkristallen sowie für die Übernahme des Korreferats.

Ich danke Dr. Cornelia Göbel für die Hilfe bei der Benutzung der HPLC, HPLC/MS<sup>2</sup> und GC/MS, die hilfreichen Diskussionen, die Geduld und aufmunternden Worte.

PD Dr. Marina Bennati und Dr. Alistair Fielding danke ich für die Zusammenarbeit, die ESR-Spektroskopie-Analysen und die aufschlussreichen Diskussionen zu weiteren Fragestellungen.

Mein Dank gehört außerdem Prof. Dr. Ulf Diederichsen und André Nadler für die Kollaboration, die Hilfe bei CD-spektroskopischen Analysen und die Synthese deuterierter Fettsäure-Derivate.

Bei Herrn Prof. Dr. Kai Tittmann möchte ich mich für die netten und interessanten Diskussionen, die motivierenden Worte und die Möglichkeit bedanken, die Analysegeräte in seiner Abteilung zu nutzen.

Bei Theres Riemekasten und Sabine Freitag möchte ich mich für die Hilfe und Unterstützung im Laboralltag, die humorvollen Gesprächsthemen und die tolle Zeit im Labor bedanken.

Alexandra Andreou, Kristl Sauer, Theres Riemekasten, Julia Scholz, Stefan Schneider und Alena Liavonchanka möchte ich für die extrem angenehme Atmosphäre im Labor danken. Ferner sei der gesamten Abteilung Biochemie der Pflanze und der Abteilung Bioanalytik für das äußerst angenehme Arbeitsklima und für die Bereitschaft, mir mit Rat und Tat zu Seite zu stehen, gedankt.

Außerdem möchte ich Danilo Meyer, Stefan Lüdtke, Michael Scharnewski, Cornelia Göbel und Alexandra Andreou für die gelegentlichen Beschäftigungen am Feierabend danken.

Mein Dank gilt außerdem dem Graduiertenkolleg IRTG1422 „*Metal Sites in Biomolecules: Structures, Regulation and Mechanisms*“ für die finanzielle Unterstützung während der Forschungszeit und für die überaus interessanten *workshops*. Die Möglichkeit mit Spezialisten aus unterschiedlichen Forschungsfeldern zusammenzuarbeiten trug nicht nur beim Entstehen dieser Arbeit bei, sondern bot zudem die Gelegenheit neue Methoden zu erlernen und Ergebnisse differenziert zu interpretieren. Ferner möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Franc Meyer für die hervorragende Koordinierung des Graduiertenkollegs bedanken. Dalila Griffin und Dr. Hanna Steininger danke ich für die Hilfe beim Lösen verschiedener bürokratischer Probleme. Weiterhin gilt mein Dank allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs für die angenehme Atmosphäre bei den Mittwoch-Abend-Seminaren sowie bei den verschiedenen *workshops*.

Ferner möchte ich mich bei Sabrina Brandt, Dr. Rudolf Brodhun, Gabriele Brodhun, Stefan Lüdtke, Dr. Ellen Hornung und Dr. Cornelia Göbel für das kritische Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Freundin Sabrina und unserer gemeinsamen Tochter Maia für die Liebe, das Verständnis, die Unterstützung und das Vertrauen in mich. Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern sowie bei meinen Geschwistern Miriam, Carolin, Saskia, Julian und Ronja für das Einfühlungsvermögen, das Vertrauen, die Unterstützung und die aufbauenden Worte herzlichst bedanken. Ferner gilt mein Dank Familie Brandt, die während der gesamten Zeit unterstützend zur Seite stand.

Ohne euch alle wäre die ganze Zeit und die ganze Arbeit wesentlich schwerer gewesen.

# Lebenslauf

Name: Florian Brodhun

Geboren: 30.01.1980 in Göttingen

Nationalität: Deutsch

**Familienstand:** ledig, ein Kind

## Schule

1986-1991	Grundschule (Jahnschule)
1991-1993	Orientierungsstufe in Seesen
1993-2000	Jacobson-Gymnasium in Seesen
06/2000	Allgemeine Hochschulreife

## Studium

2001-2006	Studium an der Georg-August-Universität Göttingen
2005-2006	Staatsexamensarbeit „Biochemische Charakterisierung von Ppo-Dioxygenasen aus <i>A. nidulans</i> “, an der Georg-August-Universität Göttingen in der Abteilung Biochemie der Pflanze unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ivo Feußner.
2006	Staatsexamensprüfungen in den Fächern Chemie (erstes Unterrichtsfach), Biologie (zweites Unterrichtsfach), Pädagogik, Psychologie und Soziologie (Wahlpflichtfach)

## Promotion

12/2006-12/2009	Stipendium des Graduiertenkollegs IRTG1422 „ <i>Metal Sites in Biomolecules: Structures, Regulation and Mechanisms</i> “
12/2006-2009	Promotion „Biochemische Charakterisierung von PpoA aus <i>Aspergillus nidulans</i> “ an der Georg-August-Universität Göttingen in der Abteilung Biochemie der Pflanze unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ivo Feußner.

## Publikationen:

Brodhun, F., Göbel, C., Hornung, E. and Feussner, I. (2009) Identification of PpoA from *Aspergillus nidulans* as a fusion protein of a fatty acid heme dioxygenase/peroxidase and a cytochrome P450. *J. Biol. Chem.* **284**, 11792-11805

Andreou, A., Brodhun, F. and Feussner, I. (2009) Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Prog. Lipid Res.* **48**, 148-170

**Erklärung:**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe.

Göttingen, September 2009

Florian Brodhun