

**Molekularbiologische Untersuchungen
zur Funktion der Squalen-Hopen-Cyclase
aus *Alicyclobacillus acidocaldarius***

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

vorgelegt von

THORSTEN MERKOFER

aus Friedrichshafen

2004

Tag der mündlichen Prüfung:	15. 12. 2004
Dekan:	Prof. Dr. Friedrich Schöffl
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Karl Poralla
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Volkmar Braun

Inhaltsverzeichnis

DANKSAGUNG.....	IV
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1. EINLEITUNG	1
1.1 ALICYCLOBACILLUS ACIDOCALDARIUS.....	1
1.2 HOPANOIDE UND TERPENBIOSYNTHESE	4
1.3 TRITERPEN-CYCLASEN.....	9
1.4 SQUALEN-HOPEN-CYCLASEN.....	12
1.5 ZIEL DER ARBEIT.....	21
2. MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1 CHEMIKALIEN UND GERÄTE.....	22
2.2 BAKTERIENSTÄMME, PLASMIDE UND OLIGONUKLEOTIDE	24
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> Stämme.....	24
2.2.2 Klonierungsvektoren.....	24
2.2.3 Plasmide.....	24
2.2.4 5'-Fluorescein-markierte Sequenzierprimer.....	25
2.2.5 Mutageneseprimer	26
2.2.6 Selektionsprimer	26
2.3 NÄHRMEDIEN UND KULTURBEDINGUNGEN.....	26
2.3.1 Nährmedien.....	26
2.3.2 Kultivierung der Zellen	27
2.3.3 Stammhaltung	28
2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	28
2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA.....	28
2.4.2 Quantifizierung von DNA.....	29
2.4.3 Restriktionsverdau	29
2.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten	29
2.4.5 Herstellung kompetenter Zellen	30
2.4.6 Transformation	30
2.4.7 Ortsspezifische Mutagenese.....	30
2.4.8 Agarose-Gelelektrophorese	32
2.4.9 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen.....	32
2.4.10 DNA-Sequenzierung.....	32
2.4.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	33
2.5 IMMUNOLOGISCHE METHODEN.....	33
2.5.1 Western-Blot	33
2.5.2 Kolonie-Western-Blot.....	34

2.5.3	<i>Immunologischer SHC-Nachweis</i>	34
2.6	PROTEINCHEMISCHE METHODEN	36
2.6.1	<i>Proteinbestimmung nach Lowry</i>	36
2.6.2	<i>SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese</i>	36
2.6.3	<i>Färbung von SDS-Gelen</i>	37
2.6.4	<i>Überexpression der SHC in Escherichia coli</i>	38
2.6.5	<i>Zellaufschluß</i>	38
2.6.6	<i>SHC-Anreicherung durch Membranpräparation</i>	39
2.6.7	<i>SHC-Anreicherung durch Hitzedenaturierung</i>	40
2.6.8	<i>Thermostabilität der SHC</i>	41
2.6.9	<i>Proteinreinigung durch Metallaffinitätschromatographie</i>	41
2.6.10	<i>Proteinreinigung durch Anionenaustauschchromatographie</i>	41
2.6.11	<i>Enzymtests</i>	42
2.6.12	<i>Molekulargewichtsbestimmung der SHC durch Gelfiltration</i>	43
2.6.13	<i>Molekulargewichtsbestimmung der SHC durch FPLC</i>	43
2.6.14	<i>Limitierte Proteolyse durch Trypsinverdau</i>	44
2.6.15	<i>N-terminale Ansequenzierung durch Edman-Abbau</i>	44
2.7	LIPIDEXTRAKTION, REINIGUNG UND ANALYSE	45
2.7.1	<i>Lipidextraktion aus Enzymtests</i>	45
2.7.2	<i>Lipidtrennung durch Dünnschichtchromatographie</i>	46
2.7.3	<i>Gaschromatographie (GC)</i>	46
2.7.4	<i>Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC/MS)</i>	47
2.7.5	<i>NMR-Analysen</i>	47
2.8	COMPUTERANALYSEN.....	47
2.8.1	<i>Analyse von DNA- und Proteinsequenzen</i>	47
2.8.2	<i>Molecular Modelling</i>	47
2.8.3	<i>Analyse von Protein-3D-Strukturen</i>	48
2.8.4	<i>Gel-Densitometrie</i>	48
2.8.5	<i>Digitalisierung von Meßwerten</i>	48
3.	ERGEBNISSE	49
3.1	KORREKTUR DER SHC-SEQUENZ.....	49
3.1.1	<i>Neusequenzierung</i>	49
3.1.2	<i>Analyse der korrigierten SHC-Sequenz</i>	53
3.2	DELETIONSMUTANTEN DER SHC	54
3.2.1	<i>Konstruktion der Deletionsmutationen</i>	54
3.2.2	<i>Proteinreinigung der Deletionsmutanten</i>	55
3.2.3	<i>Enzymtest und Produktanalyse der Deletionsmutanten</i>	57
3.2.4	<i>Charakterisierung der SHC-Deletionsmutanten</i>	57
3.2.4.1	<i>DelN1</i>	57
3.2.4.2	<i>DelN2</i>	58
3.2.4.3	<i>C-terminale Deletionsmutanten</i>	58

3.3	ALANIN-SCANNING-MUTAGENESE DER SHC	60
3.3.1	<i>Konstruktion der SHC-Mutanten</i>	60
3.3.2	<i>Proteinreinigung</i>	63
3.3.3	<i>Enzymtest</i>	64
3.3.4	<i>Charakterisierung der Alanin-scanning-Mutanten</i>	65
3.3.4.1	Wildtyp-SHC	65
3.3.4.2	H451A-SHC	66
3.3.4.3	W489A-SHC	68
3.3.4.4	F601A-SHC	69
3.3.4.5	Y420A-SHC	72
3.4	MOLECULAR MODELLING	76
3.4.1	<i>Röntgenstrukturdaten der SHC</i>	76
3.4.2	<i>Aktives Zentrum der SHC</i>	77
3.4.3	<i>Struktur der SHC-Produkte</i>	77
3.4.4	<i>Modellierung der SHC-Produkte in das aktiven Zentrum der SHC</i>	77
3.4.5	<i>Simulation der Mutagenesen durch Molecular Modelling</i>	79
3.5	LIMITIERTE PROTEOLYSE DER SHC	79
3.5.1	<i>Trypsinverdau</i>	79
3.5.2	<i>N-terminale Ansequenzierung des SHC-Fragments</i>	80
3.6	OLIGOMERISIERUNG DER SHC UNTER NATIVEN BEDINGUNGEN	81
3.6.1	<i>Gelfiltrationschromatographie</i>	81
3.6.2	<i>FPLC-Analysen</i>	81
4	DISKUSSION	83
4.1	DIE SEQUENZ DER SHC AUS ALICYCLOBACILLUS ACIDOCALDARIUS	83
4.2	SEQUENZVERGLEICH UND EVOLUTION DER TRITERPEN-CYCLASEN	88
4.3	OLIGOMERISIERUNG DER SHC AUS ALICYCLOBACILLUS ACIDOCALDARIUS	106
4.4	DELETIONSMUTAGENESE DER SHC	108
4.4.1	<i>N-terminale Deletionen</i>	109
4.4.2	<i>C-terminale Deletionen</i>	110
4.5	BESTIMMUNG DER TRYPSINSCHNITTSTELLE IN DER SHC-SEQUENZ	112
4.6	MUTAGENESE VON AMINOSÄUREN DES AKTIVEN ZENTRUMS DER SHC	114
4.6.1	<i>H451A-SHC</i>	115
4.6.2	<i>W489A-SHC</i>	119
4.6.3	<i>F601A-SHC</i>	122
4.6.4	<i>Y420A-SHC</i>	127
4.7	NEUES MODELL FÜR DEN REAKTIONSMCHANISMUS DER SHC UND AUSBLICK	131
5.	ZUSAMMENFASSUNG	140
6.	ANHANG	142
7.	LITERATURVERZEICHNIS	158

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Lehrstuhl Mikrobiologie/Biotechnologie der Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen angefertigt.

Mein Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Karl Poralla, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit durchgeführt wurde, für die Überlassung des Themas, seiner Unterstützung und Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Volkmar Braun für sein Interesse an dieser Arbeit und deren Förderung durch meine Aufnahme in das Graduiertenkolleg Mikrobiologie.

ganz besonders Herrn Ulrich Wendt (Institut für Organische Chemie und Biochemie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau) für die Informationen zur Röntgenstruktur der Squalen-Hopen-Cyclase, den hilfreichen Tips und zahlreichen Gespräche, die wesentlich zum Erfolg der Arbeit beigetragen haben.

Frau Dr. Catherine Pale-Grosdemange und Herrn Prof. Dr. Michel Rohmer (Institut Le Bel, Université Louis Pasteur, Straßburg) für die Strukturaufklärung der neuen Produkte der mutierten Cyclasen.

Graeme Nicholson (Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen) für die Durchführung der GC/MS-Analysen.

Herrn Thomas Härtner für die technische Unterstützung und seine Hilfsbereitschaft.

Frau Anette Tippelt für die überaus angenehme Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen während der gemeinsamen Zeit im Labor und in den Jahren danach.

Frau Beate Busch für die Möglichkeit zur Durchführung der FPLC-Analysen.

Den Mitgliedern der AG Prof. Poralla, den Mitarbeiterinnen der AG Prof. Winkelmann und der anderen mikrobiologischen Arbeitsgemeinschaften sowie den Mitgliedern des Graduiertenkollegs Mikrobiologie für die gute Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen.

und schließlich noch ganz besonders meiner Familie für die Unterstützung und die Geduld während der Fertigstellung dieser Arbeit.

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström (0,1 nm)
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	zweifach destilliert
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
C ₈ E ₄	n-Octyl-Tetraoxyethylen
CoA	Coenzym A
DC	Dünnschichtchromatographie
deion.	deionisiert
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
FPP	Farnesyldiphosphat
g	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatographie
GC/MS	Gaschromatographie/Massenspektroskopie
GPP	Geranyldiphosphat
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
i.D.	innerer Durchmesser
IPP	Isopentenylidiphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
l	Liter
LDAO	Lauryldimethylaminoxid (N,N-Dimethyl-dodecyl-N-oxid)
LB	Luria Broth
M ⁺	Molekular-Ion
MW	Molekulargewicht
NMR	Kernspinresonanz (<i>nuclear magnetic resonance</i>)

NTA	Nitrilo-Tri-Essigsäure (<i>trinitrilo acetic acid</i>)
OD	Optische Dichte
OSC	Oxidosqualen-Cyclase(n)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglycol
PP _i	anorganisches Pyrophosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
RT	Retentionszeit
SDS	Na-Dodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SHC	Squalen-Hopen-Cyclase(n)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenamin
TIGR	The Institute for Genomic Research
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)

Nicht aufgeführt sind die in der Molekularbiologie üblichen und in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen für Nukleotide und Aminosäuren sowie SI-Einheits- und deren dezimale Vielfache bzw. Teile.

Ergebnisse dieser Arbeit wurden publiziert in:

THORSTEN MERKOFER, CATHERINE PALE-GROSDÉMANGE, KARL ULRICH WENDT, MICHEL ROHMER, KARL PORALLA: Altered product pattern of a squalene-hopene cyclase by mutagenesis of active site residues. *Tetrahedron Letters* **40** (1999): 2121 - 2124

CATHERINE PALE-GROSDÉMANGE, THORSTEN MERKOFER, MICHEL ROHMER, KARL PORALLA: Production of bicyclic and tricyclic triterpenes by mutated squalene-hopene cyclase. *Tetrahedron Letters* **40** (1999): 6009 - 6012

1. Einleitung

1.1 *Alicyclobacillus acidocaldarius*

Die Entdeckung und Erforschung extremophiler Bakterien gehört sicherlich zu einem der interessantesten Gebiete der modernen Mikrobiologie. Im Verlauf dieser Forschungsaktivitäten konnten eine Vielzahl bisher unbekannter Mikroorganismen mit häufig ungewöhnlichen Eigenschaften isoliert und charakterisiert werden. Diese Eigenschaften – neue Naturstoffe oder Enzyme mit ungewöhnlichen Eigenschaften als Anpassung an die extremen Umweltbedingungen – werden neben ihrer Bedeutung für die Grundlagenforschung (z.B. DNA-Polymerasen thermophiler Organismen für die PCR) auch zunehmend für die biotechnologisch-industrielle Anwendung interessant (HUBER, 1993). Vergleichende Sequenzanalysen der 16S rRNA dieser Organismen revolutionierten schließlich die bisher gültigen Vorstellungen von der Evolution der Lebewesen und deren Verwandtschaftsverhältnissen. Es zeigte sich, daß die meisten extremophilen Arten und die bisher bekannten Bakterien zwei phylogenetisch getrennte Gruppen von Organismen darstellen. Diesen Erkenntnissen wurde schließlich durch die Aufteilung der Prokaryoten in die beiden Domänen *Archaea* und *Bacteria* Rechnung getragen (WOESE, 1987; WOESE *et al.*, 1990).

Die thermophilen Mikroorganismen mit ihren Temperaturoptima zwischen 45 und 115 °C gehören sicherlich zu den am besten erforschten Vertretern der Extremophilen (MADIGAN & MARRS, 1997). Bei den aufsehenerregenden Entdeckungen der letzten Jahre wird leicht übersehen, daß Lebewesen in Biotopen mit hohen Umgebungstemperaturen schon seit der Antike bekannt sind. So finden sich schon bei Plinius dem Älteren in dessen *Historia naturalis* Hinweise auf „grüne Pflanzen“ in den heißen Quellen von Abano südwestlich von Padua (BROCK, 1978). Danach wurden die Bewohner heißer Quellen jedoch für fast zwei Jahrtausende kaum noch beachtet. Erst mit dem Siegeszug der Naturwissenschaften im 19. Jahrhundert wandte man sich wieder diesen außergewöhnlichen Lebewesen zu. Erleichtert wurde dies auch dadurch, daß den Forschern nun Mikroskope und andere technische Hilfsmittel für die Erforschung dieser Organismen zur Verfügung standen. Eines der ersten Ziele, dem sich verschiedene Forscher zuwandten, waren die Algen in den Karlsbader Thermalquellen. Später wurden diese Forschungsarbeiten erweitert und auf die italienischen Thermalquellen in Abano, auf Sizilien und auf Ischia ausgedehnt (HUBER, 1993). Seit Anfang des 20. Jahrhunderts wurden mit der Erforschung der Selbstentzündung des Heus sowie von Verrottungsprozessen auch terrestrische Biotope entdeckt, deren Bewoh-

ner Temperaturen bis zu 80 °C vertragen (MIEHE, 1907; HILDEBRANDT, 1927; NORMAN *et al.*, 1941).

Den Durchbruch bei der Erforschung thermophiler Bakterien brachte schließlich die systematische Bearbeitung der Bewohner heißer Quellen im Yellowstone National Park durch Thomas D. Brock und seine Mitarbeiter in den Jahren 1965 - 1975 (BROCK, 1978). Dabei konnten nicht nur eine Reihe neuer Arten isoliert und beschrieben werden (z.B. *Thermus aquaticus*, *Sulfolobus acidocaldarius*), sondern auch deren Morphologie, physiologische Eigenschaften sowie die Ökologie und die Verbreitung der Bakterien in diesen Extrembiotopen erforscht werden. Diese Langzeitstudien sorgten dafür, daß nun auch andere Forscher damit begannen, weltweit diese Organismen zu erforschen. Heute sind außer aus den USA solche Arten auch aus Island, Italien, Japan, Neuseeland, der Antarktis und anderen Regionen der Welt bekannt, wo geothermale Aktivitäten die notwendigen Umweltbedingungen für thermophile Organismen schaffen. Die technische Entwicklung der Meeres- und Tiefseeforschung ermöglichte schließlich 1977 die Entdeckung neuer Biotope hyperthermophiler Prokaryoten in den submarinen Hydrothermalquellen im Bereich der mittelozeanischen Rücken (JANNASCH, 1993).

Bei den schon erwähnten Forschungsarbeiten von BROCK *et al.* im Yellowstone Nationalpark wurden auch thermoacidophile sporenbildende Bakterien isoliert. Die Fähigkeit dieser gram-positiven stäbchenförmigen Zellen, Endosporen zu bilden, legte eine taxonomische Eingruppierung der Isolate in die Gattung *Bacillus* nahe. Ähnlichkeiten bestanden schon zu aus Japan beschriebenen Isolaten (UCHINO & DOI, 1967). Diese Autoren hatten die Morphologie und die intrazelluläre Lage der Endosporen für die taxonomische Auswertung herangezogen und ihre Isolate als nahe Verwandte der schon bekannten Art *Bacillus coagulans* beschrieben. Eine Bestimmung des GC-Gehalts lieferte mit ca. 62 % jedoch einen Wert, der deutliche vom GC-Gehalt *B. coagulans* und anderer *Bacillus*-Arten abwich. Zudem waren die neuen Isolate noch acidophiler als *B. coagulans*. Aus diesem Grund wurden sie als neue Art *B. acidocaldarius* klassifiziert (DARLAND & BROCK, 1971). Mit der Fähigkeit, in Biotopen mit Temperaturen zwischen 45 und 70 °C (Optimum 60 - 65 °C) und einem pH-Bereich zwischen 2 und 6 (Optimum pH 3 - 4) zu leben, gehört diese Art mit zu den ersten isolierten Extremophilen. Zur gleichen Zeit wurde dieser Organismus auch aus der vulkanischen Umgebung Neapels isoliert (DE ROSA *et al.*, 1971a). Genauere Analysen der Lipide dieser Isolate zeigten, daß neben den für *Bacillus*-Arten typischen Fettsäuren *iso*-C₁₅, *iso*-C₁₆, *iso*-C₁₇, *anteiso*-C₁₅, *anteiso*-C₁₇, *n*-C₁₄ und *n*-C₁₆ auch ungewöhnliche ω-Cyclohexylfettsäuren vorhanden sind. Die charakterisierten Fettsäuren 11-Cyclohexyl-

undecansäure (ω -Cyclohexyl-C₁₇) und 13-Cyclohexyltridecansäure (ω -Cyclohexyl-C₁₉) sind sogar die dominierenden Fettsäuren in den Lipiden dieser Bakterien (DE ROSA *et al.*, 1971b; 1972; 1974).

Von besondere Bedeutung war schließlich die Isolierung eines pentacyclischen Triterpens (DE ROSA *et al.*, 1971a, 1973), welches zur gleichen Zeit auch in dem methanotrophen *Methylococcus capsulatus* gefunden wurde (BIRD *et al.*, 1971). Mit der Identifizierung dieses Triterpens als Hopan (Hop-22(29)-en, Diplopten; **Abbildung 1**) gelang der erste Nachweis eines aus Squalen gebildeten Triterpens in Prokaryoten. LANGWORTHY *et al.* konnten schließlich mit der Isolierung des Bacteriohopantetrols (BHT) und dessen Glycolipidderivates aus den Lipiden von *B. acidocaldarius* Hopanmoleküle mit einer am C-29 verlängerter Seitenkette nachweisen (LANGWORTHY *et al.*, 1976; LANGWORTHY & MAYBERRY, 1976). Zur selben Zeit konnten auch ROHMER *et al.* die BHT-Struktur aus *Acetobacter xylinum* aufklären und damit frühere Strukturvorschläge von FÖRSTER *et al.* korrigieren (FÖRSTER *et al.*, 1973, ROHMER & OURISSON, 1976).

Vergleichende Sequenzanalysen der 16S rRNA machten deutlich, daß sich *B. acidocaldarius* zusammen mit den Arten *B. acidoterrestris* und *B. cycloheptanicus* (DEINHARD, 1987, DEINHARD *et al.*, 1987a, 1987b) phylogenetisch stark von den anderen bekannten *Bacillus*-Arten unterscheidet. Deshalb wurden diese drei Arten bei einer Reklassifizierung in die neu geschaffene Gattung *Alicyclobacillus* eingruppiert (WISOTZKEY *et al.*, 1992). Dafür sprach auch das für diese drei Arten typische Vorkommen von ω -Cycloalkyl-Fettsäuren in deren Lipiden (DEINHARD & PORALLA, 1996).

Als einer der ersten genauer untersuchten thermophilen Mikroorganismen hat sich die nun *Alicyclobacillus acidocaldarius* genannte Art inzwischen zu einem gut untersuchten Modellorganismus für moderat thermophile Bakterien entwickelt. So hat die wissenschaftliche Bearbeitung dieser Art entscheidend zum Wissen über die bakterielle Triterpenbiosynthese beigetragen (siehe 1.2). Weitere aktuelle Forschungsprojekte mit diesem Organismus betreffen die Struktur und Funktion thermostabiler Enzyme (SCHWERMANN *et al.*, 1994), die Biosynthese der ungewöhnlichen Fettsäuren in den Lipiden (MOORE *et al.*, 1993; MOORE & FLOSS, 1994) oder die Erforschung von Schwermetall-Bindeproteinen (CAPASSO *et al.*, 1996), Maltose-Bindeproteine (HERRMANN *et al.*, 1996) und anderer Moleküle. Auch nachdem inzwischen eine Reihe von Prokaryoten bekannt sind, die bei weit höheren Umgebungstemperaturen leben, hat dadurch das Interesse an dem thermoacidophilen *A. acidocaldarius* also nicht nachgelassen.

1.2 Hopanoide und Terpenbiosynthese

Das Hopan, welches 1971 DE ROSA *et al.* in *Alicyclobacillus acidocaldarius* und BIRD *et al.* in *Methylococcus capsulatus* nachgewiesen hatten, war nicht der erste bekannte Vertreter der Hopanoide. Diese pentacyclischen Triterpene sind bei der chemischen Analyse von Dammarharzen entdeckt worden, die von MILLS & WERNER durchgeführt wurden (MILLS & WERNER, 1955). Diese Harze stammen von verschiedenen südostasiatischen Baumarten aus der Familie der *Dipterocarpaceae* und werden unter anderem für hochwertige Lacke und Firnisse verwendet. Vom Namen der Gattung *Hopea*, zu der wichtige Dammar-Lieferanten gehören, wurde auch der Name der Hopanoide abgeleitet. Carl von Linné hatte mit der Benennung dieser Gattung in einer für ihn typischen Weise den Botaniker John Hope (1725 - 1786) ausgezeichnet, der als überzeugter Anhänger Linnés dessen taxonomisches System in Schottland anwendete und dort zu seiner Verbreitung beitrug (CHALMERS, 1814; LEE, 1891; GOERKE, 1992).

Seit dem Nachweis in Baumharzen konnten Hopanoide immer wieder aus Flechten, Farnen und höheren Pflanzen isoliert werden. Dennoch sind sie selten und nur eine von vielen Triterpengruppen, die in Pflanzen vorkommen (OURISSON & ALBRECHT, 1992). In bedeutend größeren Mengen konnten Hopanoide dagegen im Rohöl, in Kohlen und in nahezu allen Sedimenten nachgewiesen werden. Nach Schätzungen stellen diese Geohopanoide mit einer Gesamtmenge von ungefähr 10^{12} Tonnen die nach Methan mengenmäßig größte Klasse organischer Substanzen auf diesem Planeten (OURISSON *et al.* 1984; PRINCE, 1984). Problematisch war die Frage nach der Herkunft dieser Geohopanoide, da die bisher aus Pflanzen bekannten Hopanoide aufgrund ihrer geringen Verbreitung und wegen struktureller Unterschiede dafür nicht in Frage kommen. Erst die schon erwähnte Entdeckung des Bacteriohopantetrols in bakteriellen Lipiden brachte hier eine Lösung (FÖRSTER *et al.*, 1973; ROHMER & OURISSON., 1976; LANGWORTHY *et al.*, 1976). Bei diesen C₃₅-Hopanoiden ist – wie bei den meisten Geohopanoiden – das Hopanmolekül durch eine Seitenkette am C-29 verlängert.

Eine systematische Suche in Bakterien lieferte schließlich den Nachweis, daß die Hopanoide bei Prokaryoten weit verbreitet sind (ROHMER *et al.*, 1984). Bei mehreren hundert daraufhin untersuchten Stämmen konnten in mindestens 30 % der Fälle Hopanoide nachgewiesen werden. Bisher konnten mit Ausnahme der *Archaea*, *Chromatiaceae* und *Enterobacteriaceae* in allen taxonomischen Bakteriengruppen Arten mit Hopanoiden nachgewiesen werden. Bis heute ist eine Korrelation zwischen taxonomischer Stellung und Hopanoidvorkommen nicht möglich (SAHM *et al.*, 1993; KANNENBERG & PORALLA, 1999). Wie

bei den Geohopanoïden sind auch bei den bakteriellen inzwischen eine Reihe von Strukturvarianten bekannt (**Abbildung 1**). Bei den elongierten Hopanoïden ist das C₃₀-Grundgerüst mit einer C₅-Polyol-Seitenkette verlängert, deren Hydroxylgruppen auch durch Aminogruppen, Zucker, Aminosäuren oder Nucleoside ersetzt werden kann (FLESCH & ROHMER, 1988; OURISSON & ROHMER, 1992). Weitere Molekülmodifikationen sind z.B. durch Methylierungen möglich (OURISSON *et al.*, 1987).

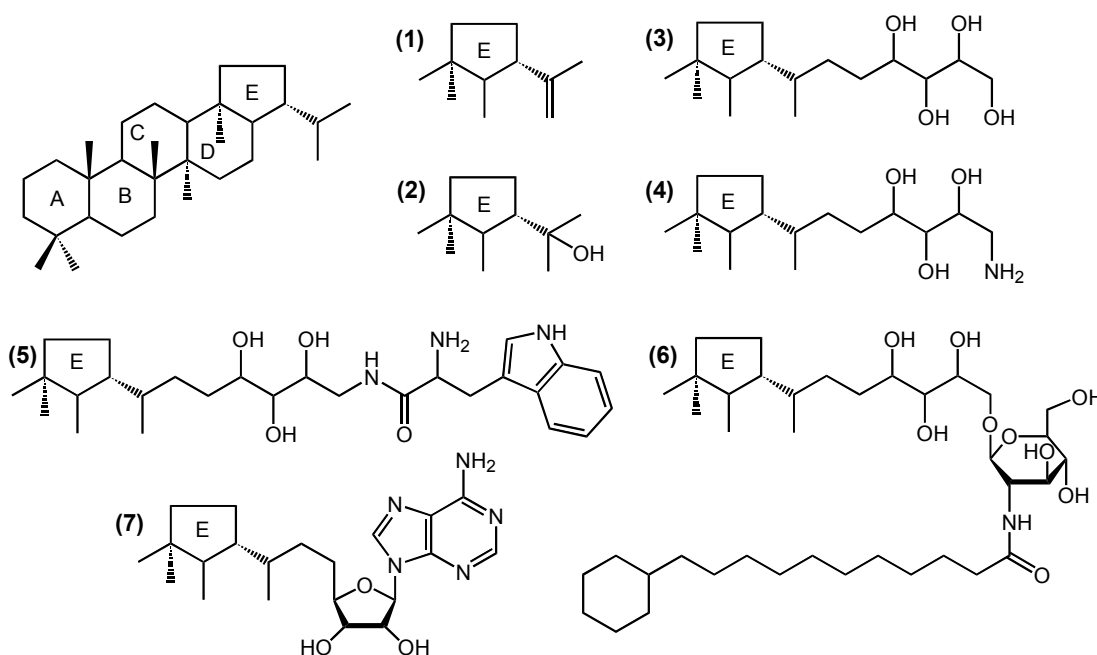


Abbildung 1: Pentacyclische Hopanoïdgrundstruktur und einige Beispiele für die Seitenketten des E-Rings bakterieller Hopanoïde: (1) Hopen = Hop-22(29)-en = Diplopten; (2) Diplopterol; (3) Bacteriohopantetrol (BHT); (4) Bacteriohopanaminotriol (BHAT); (5) Bacteriohopanaminotriol-Tryptophan; (6) Bacteriohopanglycolipid; (7) Adenosylhopan.

Hopanoïde und speziell die elongierten Vertreter besitzen in der Struktur des starren Ring-systems, dessen Dimensionen sowie dem amphiphilen Charakter Ähnlichkeiten mit den Steroiden in eukaryotischen Membranen. Die Vermutung, daß sie diesen funktionsäquivalent sind und ebenfalls als Membranverstärker wirken (ROHMER *et al.*, 1979), konnte durch Versuche mit Modellmembranen nachgewiesen werden (KANNENBERG *et al.*, 1980). Dafür spricht auch, daß bei *A. acidocaldarius* der Hopanoïdgehalt mit steigender Wachstumstemperatur und fallendem pH-Wert zunimmt (PORALLA *et al.*, 1984). Bei einer Hemmung der Hopanoïdbiosynthese durch Inhibitoren konnten zusätzlich eine Wachstumsbeeinträchtigung verschiedener Bakterien und eine verminderte Ethanolresistenz bei *Zymomonas mobilis* beobachtet werden (HORBACH *et al.*, 1991). Ob Hopanoïde daneben noch weitere Funktionen in Prokaryoten besitzen, wie dies bei den eukaryotischen Steroiden der Eukaryoten der Fall ist (Hormone, Toxine, Gallensäuren etc.), ist noch unbekannt (OURISSON & ROHMER, 1992).

Terpene, zu denen die Hopanoide gehören, bilden mit mehr als 22.000 bekannten Verbindungen die größte Naturstoffgruppe (CONOLLY & HILL, 1991). So vielfältig wie die Strukturen sind auch die Funktionen dieser Verbindungen, die sie in Mikroorganismen, Tieren und Pflanzen besitzen. So übernehmen sie Funktionen als Photosynthesepigmente (Carotinoide), Membranlipide (Sterole, Hopanoide), Hormone (Gibbereline, Steroide), Duft-, Lock- und Abwehrstoffe (Phytoalexine, Saponine) sowie bei intrazellulären Signaltransduktionsprozessen (Proteinprenylierung). Vor allem in den höheren Pflanzen besitzen Terpene ihre maximale Verbreitung und Strukturdiversität. So waren allein bis 1985 aus *Nicotiana* sp. fast 500 verschiedene Terpene bekannt (BACH, 1995).

Ihre Biosynthese läßt sich in vier wichtige Teilschritte unterteilen: (1) Biosynthese der C₅-Grundeinheit, (2) Verknüpfung mehrerer C₅-Einheiten zu den Ausgangsverbindungen der Mono-, Sesqui-, Di-, Tri-, Tetra- und Polyterpenen, (3) Bildung der Grundgerüste cyclischer Terpene durch intramolekulare Cyclisierungsreaktionen und (4) weitere Modifikationen durch Hydroxylierungen, Methylierungen, Isomerisierungen etc., die vor allem für die außerordentliche Vielfalt dieser Naturstoffgruppe verantwortlich sind (CHAPPEL, 1995).

Die isomeren C₅-Verbindungen Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) bilden die biosynthetische Grundeinheiten aller Terpene. Ihre Biosynthese kann über zwei verschiedene Stoffwechselwege erfolgen (**Abbildung 2**). Beim klassischen Mevalonat-Weg, der schon in den 1960er Jahren von BLOCH, LYNEN *et al.* aufgeklärt wurde, wird IPP aus drei Molekülen Acetyl-CoA über die Zwischenprodukte Hydroxymethylglutaryl-CoA und Mevalonat gebildet (BLOCH, 1992). Dieser Weg findet sich bei Archaeobakterien, Eukaryoten und im Cytosol von Pflanzen. Der alternative mevalonatunabhängige Weg wurde dagegen erst vor wenigen Jahren entdeckt (FLESCH & ROHMER, 1988; HORBACH *et al.*, 1993; ROHMER *et al.*, 1993). Seit der Entdeckung des ersten Enzym dieses Biosyntheseweges (ROHMER *et al.*, 1996; LOIS *et al.*, 1998) konnten in den letzten Jahren sieben Reaktionsschritte und die dafür verantwortlichen Enzyme identifiziert werden (KUZUYAMA, 2002; SEEMANN *et al.*, 2002; WOLFF *et al.*, 2003). Hier werden IPP und DMAPP aus Glycerinaldehyd-3-Phosphat und Pyruvat gebildet, wobei letzteres decarboxyliert wird und die dabei entstehende C₂-Einheit über Thiamindiphosphat (TPP) auf Glycerinaldehyd-3-Phosphat übertragen wird. Dieser Syntheseweg konnte inzwischen bei vielen Eubakterien, Grünalgen und in den Chloroplasten höherer Pflanzen nachgewiesen werden (BACH, 1995, LICHTENTHALER, 1998).

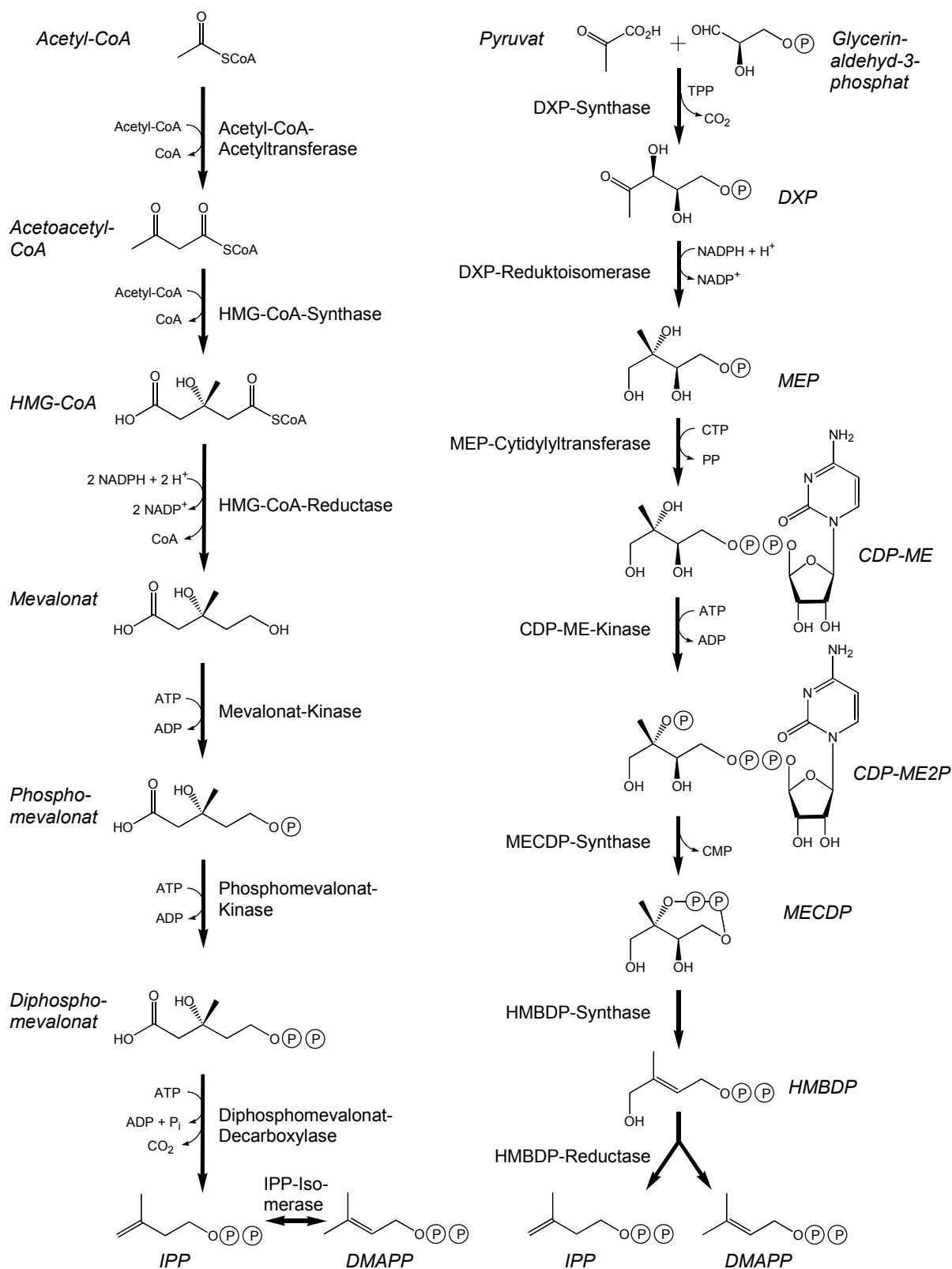


Abbildung 2: Biosynthese von Isopentenylidiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) über den Mevalonat- (links) bzw. den mevalonatanabhängigen Syntheseweg (rechts). HMG-CoA: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA; TPP: Thiamindiphosphat; DXP: 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphat; MEP: 2-C-Methyl-D-erythritol-4-phosphat; CDP-ME: 4-(Cytidin-5'-diphospho)-2-C-Methyl-D-erythritol; CDP-ME2P: 2-Phospho-4-(cytidin-5'-diphospho)-2-C-methyl-D-erythritol; MECDP: 2-C-Methyl-D-erythritol-2,4-cyclodiphosphat; HMBDP: 1-Hydroxy-2-methyl-2-(E)-butenyl-4-diphosphat (nach KUZUYAMA, 2002 & WOLFF *et al.*, 2003).

DMAPP dient als Starter der Kondensationsreaktion mit IPP. Prenyltransferasen katalysieren die sukzessive 1'-4-Addition weiterer IPP-Moleküle, wodurch Geranyldiphosphat (GPP; C₁₀), Farnesyldiphosphat (FPP; C₁₅), Geranylgeranyldiphosphat (GGPP; C₂₀) und höhermolekulare Terpene entstehen (**Abbildung 3**). Dabei bestimmt die Größe des aktiven Zentrums, ob es sich bei den entsprechenden Prenyltransferasen um eine GPP-, FPP- oder GGPP-Synthase handelt (TARSHI *et al.*, 1996). Bei Eukaryoten ergeben sich darüber hinaus weitere Regulationsmöglichkeiten durch die Kompartimentierung einzelner Terpenbiosynthesewege in verschiedenen Zellorganellen. (MCGARVAY & CROTEAU, 1995).

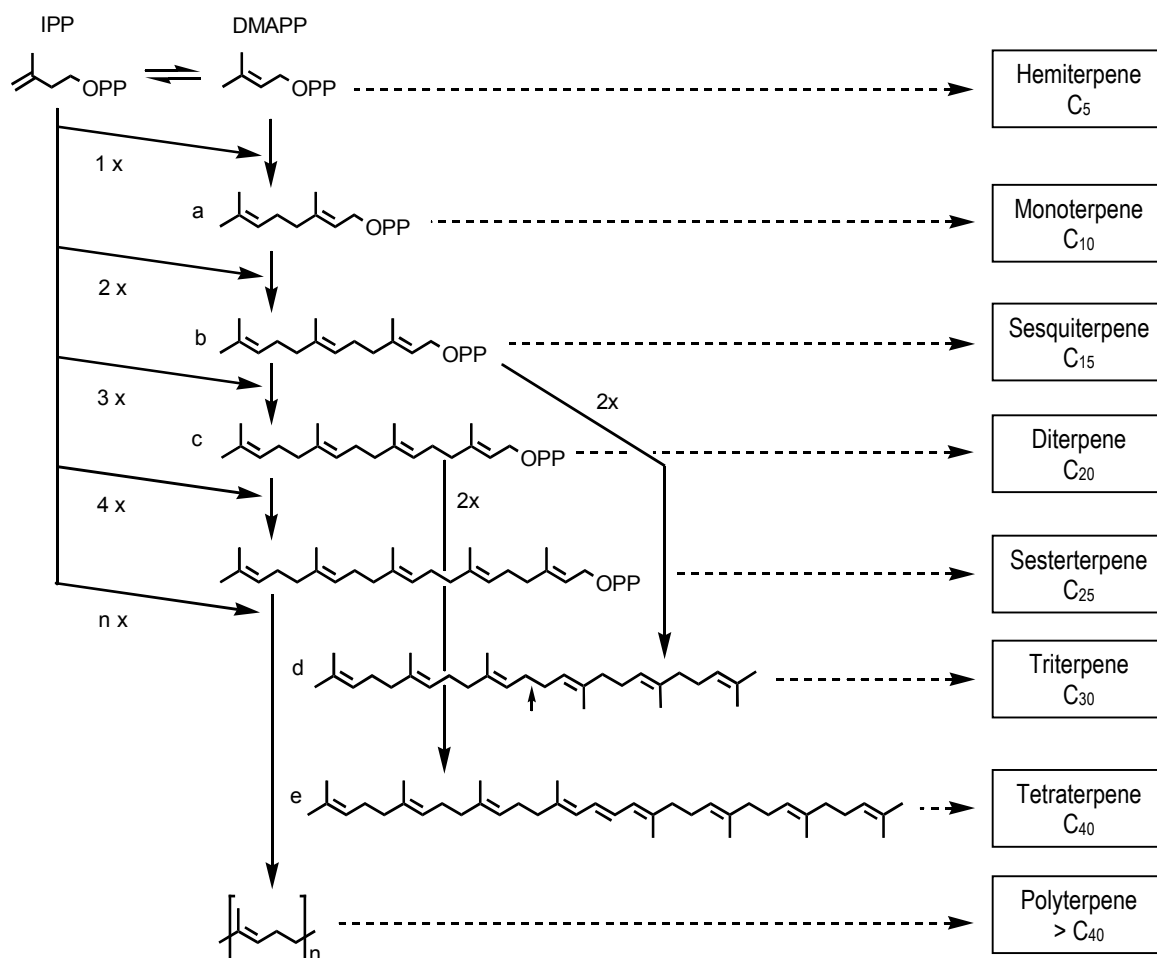


Abbildung 3: Biosynthese der Terpene. Von den beiden C₅-Einheiten Isopentenylidiphosphat **IPP** und Dimethylallyldiphosphat **DMAPP** ausgehend sind die Bildung von Geranyldiphosphat **GPP** (**a**), Farnesyldiphosphat **FPP** (**b**), Geranylgeranyldiphosphat **GGPP** (**c**), Squalen (**d**; der Pfeil markiert die Position der Doppelbindung beim Dehydrosqualen) und Phytoen (**e**) dargestellt. Während die niedermolekularen Terpene eine all-*trans* Konfiguration der Doppelbindungen aufweisen, kommen bei Polyterpenen auch all-*cis* oder gemischte *cis/trans*-Konfigurationen vor.

Die Ausgangsverbindungen der Tri- und Tetraterpene Squalen, Dehydrosqualen und Phytoen werden durch die Kondensation jeweils zweier FPP- bzw. GGPP-Moleküle gebildet. Im Gegensatz zu den von Prenyltransferasen katalysierten Reaktionen handelt es sich hier um 1'-1-Additionen. Während bei der Squalen-Synthese die zentrale Doppelbindung im

Squalen reduziert wird, bleibt diese bei der Dehydrosqualen- und Phytoen-Synthese erhalten (NES & MCKEAN, 1977, ARMSTRONG & HEARST, 1996; GIBBS, 1998). Nach zahlreichen eukaryotischen Squalen-Synthesen konnten in letzter Zeit auch die ersten Vertreter aus Prokaryoten kloniert und exprimiert werden (TIPPELT, 1997; PERZL *et al.*, 1998).

Bei der überwiegenden Zahl der Terpene handelt es sich um cyclische Verbindungen, die aus den nichtcyclischen Vorstufen durch Terpen-Cyclasen (bzw. Synthasen) gebildet werden. In den letzten Jahren konnten einige Dutzend dieser Enzyme isoliert werden. So sind alleine aus Pflanzen inzwischen mehr als 30 Terpen-Cyclasen kloniert worden (BOHLMANN *et al.*, 1998). Nach dem Startmechanismus der katalysierten Reaktion können diese Enzyme in zwei Gruppen eingeteilt werden. Terpen-Cyclasen der ersten Gruppe starten die Cyclisierungsreaktion mit der Bildung eines Carbokations durch Diphosphat-Abspaltung vom Substrat. Zu ihnen gehören Monoterpen-, Sesquiterpen- und ein Teil der Diterpen-Cyclasen sowie die schon erwähnten Prenyltransferasen. Andere Diterpen- sowie Triterpen- und Tetraterpen-Cyclasen bilden die zweite Gruppe. Bei ihnen wird das Startcarbokation durch Protonierung einer terminalen Doppelbindung des Substrats oder durch Aufspaltung des Oxiranrings gebildet. Diese Einteilung der Terpen-Cyclasen nach ihrem Reaktionsmechanismus in zwei Gruppen wird auch durch phylogenetische Analysen der Proteinsequenzen unterstützt (BOHLMANN *et al.*, 1997, 1998). Nach dem unterschiedlichen Start erfolgt bei allen Cyclasen eine Wanderung des Carbokations durch das Substratmolekül durch intramolekulare Umlagerung von Bindungen. Zusätzlich sind Hydrid- und Methyl-Verlagerungen möglich. Die Eliminierung des terminalen Carbokations kann schließlich auf unterschiedliche Weise erfolgen (Deprotonierung, Anlagerung von OH), wodurch vielfältige Reaktionsprodukte möglich sind (MCGARVEY & CROTEAU, 1995; GIBBS, 1998; BOHLMANN *et al.*, 1998). Neben hochspezifischen Terpen-Cyclasen mit nur einem einzigen Reaktionsprodukt kommen deshalb auch wesentlich unspezifischere Enzyme vor, die mehrere Reaktionsprodukte liefern. Hierzu gehören z. B. die aus *Abies grandis* isolierten Enzyme δ -Selinin-Synthase und γ -Humulen-Synthase, die insgesamt 34 bzw. 52 verschiedene Sesquiterpene produzieren (STEELE *et al.*, 1998).

1.3 Triterpen-Cyclasen

Wie bei allen anderen Terpenen überwiegen auch bei den Triterpenen die cyclischen Verbindungen. Neben wenigen bekannten mono-, bi- und tricyclischen Verbindungen dominieren eindeutig die tetra- und pentacyclischen Vertreter. Von wenigen Ausnahmen abgesehen unterscheiden sich pro- und eukaryotische Triterpen-Cyclasen beim verwendeten

Substrat. So handelt es sich bei den prokaryotischen Enzymen im allgemeinen um Squalen-Cyclasen. Dagegen wird bei Eukaryoten Squalen in der Regel erst durch eine Monooxygenase in 2,3-Oxidosqualen umgewandelt wird, welches dann durch Oxidosqualen-Cyclasen (OSC) cyclisiert wird. (ABE *et al.*, 1993; **Abbildung 4**). In den letzten Jahren konnten Triterpen-Cyclasen aus einer ganzen Reihe von Mikroorganismen, Pilzen, Pflanzen und Tieren isoliert werden. Eine Auflistung eines großen Teils der bisher klonierten und sequenzierten Triterpen-Cyclasen mit näheren Informationen zu den einzelnen Enzymen ist im **Anhang** zusammengestellt.

Nach den bisher bekannten Reaktionsprodukten können die eukaryotischen Enzyme in mehrere Gruppen von Oxidosqualen-Cyclasen eingeteilt werden. In Tieren und Pilzen ist Lanosterol das Cyclisierungsprodukt von Oxidosqualen und dient in diesen Organismen als biosynthetische Vorstufe der Zoosterole (z. B. Cholesterol) und Mycoesterole (z. B. Ergosterol). Die Reaktion wird von der Oxidosqualen-Lanosterol-Cyclase katalysiert, deren Gen bisher aus verschiedenen Säugern, Hefen und Protozoen isoliert wurde.

In photosynthetischen Organismen erfolgt die Biosynthese der Phytosterole (z. B. Sitosterol) dagegen über die dem Lanosterol strukturisomere Verbindung Cycloartenol. Das Gen der für diese Enzymreaktion verantwortlichen Oxidosqualen-Cycloartenol-Cyclase wurde aus verschiedenen Gymnospermen und Angiospermen isoliert.

Im Gegensatz zu diesen Triterpenen mit tetracyclischen Grundgerüst ist Lupeol eine pentacyclische Verbindung mit einem fünfgliedrigen E-Ring, die durch eine Oxidosqualen-Lupeol-Cyclase gebildet wird. Deren Gen konnte bisher nur aus verschiedenen Pflanzen isoliert werden.

Vom Lupeol unterscheiden sich die nachfolgenden pentacyclischen pflanzlichen Triterpene durch einen sechsgliedrigen E-Ring. α - und β -Amyrin sind häufige Bestandteile von Triterpen-Saponinen. Das Gen der Oxidosqualen- α -Amyrin-Cyclase wurde bisher nur aus *Pisum sativum* isoliert, während das der Oxidosqualen- β -Amyrin-Cyclase schon aus mehreren Pflanzen kloniert wurde.

Als vorläufig letzter Typ von Triterpen-Cyclasen wurde aus der Schwammgurke *Luffa cylindrica* das Gen einer Oxidosqualen-Isomultiflorenol-Cyclase isoliert.

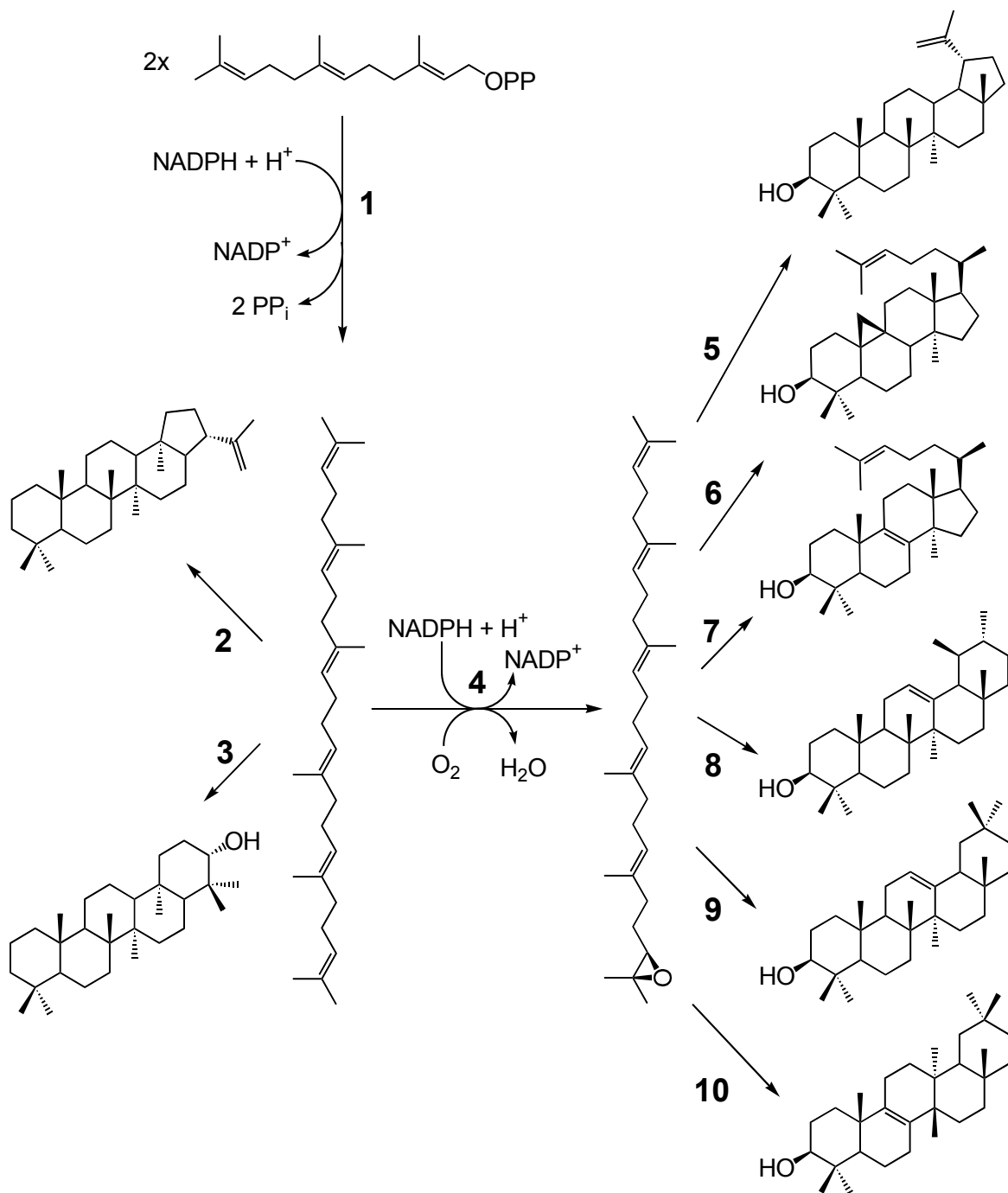


Abbildung 4: Isolierte bzw. klonierte Triterpen-Cyclasen und ihre Haupteicyclisierungsprodukte. Gezeigt ist die Biosynthese von Squalen aus zwei Molekülen Farnesyldiphosphat (FPP) durch die **Squalen-Synthase (1)** und dessen anschließende Cyclisierung durch die **Squalen-Hopen-Cyclase (2)** bzw. **Squalen-Tetrahydromanol-Cyclase (3)**. Wird Squalen durch die **Squalen-Epoxidase (4)** zum 2,3-Oxidosqualen umgewandelt, kann es von den Oxidosqualen-Cyclasen **Lupeol-Cyclase (5)**, **Cycloartenol-Cyclase (6)**, **Lanosterol-Cyclase (7)**, **α-Amyrin-Cyclase (8)**, **β-Amyrin-Cyclase (9)** bzw. **Isomultiflorenol-Cyclase (10)** umgesetzt werden.

1.4 Squalen-Hopen-Cyclasen

Bei den pentacyclischen Cyclisierungshauptprodukten von Squalen kann zwischen Hopen mit einem fünfgliedrigen E-Ring und Tetrahymanol mit einem sechsgliedrigen E-Ring unterschieden werden.

Die Squalen-Tetrahymanol-Cyclase wurde erstmals aus *Tetrahymena thermophila* isoliert (SAAR, 1989; SAAR *et al.*, 1991). Die Biosynthese von Tetrahymanol ist auch in anderen Ciliaten, einigen Pflanzen und Pilzen (MALLORY *et al.*, 1963; ZANDER *et al.*, 1969; KEMP *et al.*, 1984; HOLLER *et al.*, 1993) sowie vereinzelt auch in Prokaryoten wie *Rhodopseudomonas palustris*, *Phototrhizobium* sp. oder *Bradyrhizobium japonicum* nachgewiesen worden (KLEEMANN *et al.*, 1990; PERZL, 1996). Bisher gelang es jedoch noch nicht, das Gen dieser Cyclase zu klonieren.

Im Gegensatz dazu ist eine Aktivität der Squalen-Hopen-Cyclase (SHC), dem Schlüsselenzym der Hopanoid-Biosynthese, bisher ausschließlich aus Bakterien bekannt. So konnte nach *Alicyclobacillus acidocaldarius* (OCHS *et al.*, 1992) das Gen der SHC auch aus *A. acidoterrestris* (CHOI, 1995), *Bradyrhizobium japonicum* (PERZL *et al.*, 1997), *Methylococcus capsulatus* (TIPPELT *et al.*, 1998), *Rhodopseudomonas palustris* (RAHN, 1996) und *Zymomonas mobilis* (REIPEN *et al.*, 1995) kloniert und sequenziert werden. Auch bei der Sequenzierung mehrerer prokaryotischer Genome konnten ab 1996 eine Reihe von Sequenzen mit deutlichen Homologien zu den bekannten SHC-Genen nachgewiesen werden. In diesen Fällen muß in der Regel jedoch erst noch geklärt werden, ob das Gen in den betreffenden Organismen überhaupt exprimiert wird, ob es sich bei dem Genprodukt auch tatsächlich um eine Hopen-Cyclase handelt oder ob eventuell ein anderes Cyclisierungsprodukt gebildet wird.

Pflanzliche Hopanoide besitzen in der Regel eine Hydroxylgruppe am C-3 und gelten deshalb als Cyclisierungsprodukt des Oxidosqualens. Da jedoch noch keine Hopen-Cyclasen aus Pflanzen isoliert werden konnten, bleibt vorläufig noch offen, ob es sich hier um Oxidosqualen-3-Hydroxyhopen-Cyclasen handelt oder es sich vielmehr um Squalen-Cyclasen handelt, die aufgrund ihrer relativ geringen Substratspezifität in der Lage sind, neben Squalen auch Oxidosqualen zu cyclisieren (ABE & ROHMER, 1994).

Alle bisher charakterisierten SHC sind Proteine, die aus ca. 630 - 660 Aminosäuren bestehen (MW ca. 70 - 75 kDa) und sind damit im Durchschnitt um ca. 100 Aminosäuren kleiner als die eukaryotischen OSC (MW 78 - 88 kDa). Ein Vergleich der Aminosäuresequenz aller bekannten Squalen- und Oxidosqualen-Cyclasen zeigt deutliche Sequenz-

homologien. Neben zahlreichen über die gesamte Proteinsequenz verstreuten konservierten Aminosäuren fallen vor allem zwei Sequenzmotive auf, die für alle Triterpen-Cyclasen charakteristisch sind. Bei der als QW-Motiv bezeichneten Sequenz handelt es sich um ein repetitives, 16 Aminosäuren umfassendes Motiv mit der Konsensussequenz R/K-A/G-X₃-F/W/Y-L-X₃-Q-X₃-G-X-W. Es findet sich an entsprechenden Positionen in allen Triterpen-Cyclasen, wo es bis zu achtmal vorkommt (zur Position der QW-Motive innerhalb der Sequenz der Triterpen-Cyclasen siehe **Anhang**; PORALLA, 1994; PORALLA *et al.*, 1994). Dagegen ist das zweite, aspartatreiche Sequenzmotiv nur jeweils einmal vorhanden (ABE & PRESTWICH, 1994). Hier unterscheidet sich die Konsensussequenz D-X-D-D-T-A in Squalen-Cyclasen von der in Oxidosqualen-Cyclasen, wo dieses Motiv mit der Sequenz D-C-T-A-E auftritt (zur Funktion beider Motive siehe unten).

Die Sequenzhomologien zeigen, daß es sich bei den Triterpen-Cyclasen trotz unterschiedlicher Reaktionsprodukte der jeweiligen Enzyme um eine Gruppe phylogenetisch verwandter Proteine handelt. Es wird angenommen, daß sich die eukaryotischen OSC von den prokaryotischen SHC ableiten und die Hopanoide können somit als die phylogenetischen Vorläufer der Sterole als Membranstabilisatoren betrachtet werden (ROHMER *et al.*, 1979; PORALLA, 1982; OURISSON, 1989; OURISSON & NAKATAMI, 1994).

Ein entscheidender Beitrag zum Verständnis der Struktur und Funktion bakterieller Triterpen-Cyclasen lieferte die erfolgreiche Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse der SHC aus *A. acidocaldarius* (WENDT 1994; WENDT *et al.*, 1997; 1999). Danach besitzt das Protein eine hantelförmige Struktur, die von zwei Domänen gebildet wird, bei denen α -helicale Strukturen deutlich überwiegen (**Abbildung 5**). Die erste Domäne besitzt mit zwei konzentrischen Bündeln aus jeweils sechs α -Helices (α_6/α_6 -Barrel) eine wesentlich geordnetere Struktur als die zweite Domäne. Eventuell ist diese durch eine Genduplikation und anschließende Modifikationen aus der Domäne 1 entstanden (WENDT, 1997; WENDT & SCHULZ, 1998).

Die schon erwähnten QW-Motive stellen ein Strukturmotiv auf der Oberfläche beider Domänen dar. Sie finden sich immer am C-terminalen Ende einer äußeren α -Helix, wobei der namensgebende Teil der Sequenz (**Q-X₃-G-X-W**) eine daran anschließende Loop-Struktur ausbildet. Durch zahlreiche Wechselwirkungen zwischen benachbarten Helices stabilisieren sie das Protein, was als Anpassung an die stark exergonische Reaktion der Squalen-Cyclisierung verstanden wird (WENDT *et al.*, 1997). Inzwischen konnte durch Mutageneseexperimente für einige QW-Motive tatsächlich ein Einfluß auf die Thermostabilität des Enzyms nachgewiesen werden (SATO & HOSHINO, 1999a, 2001).

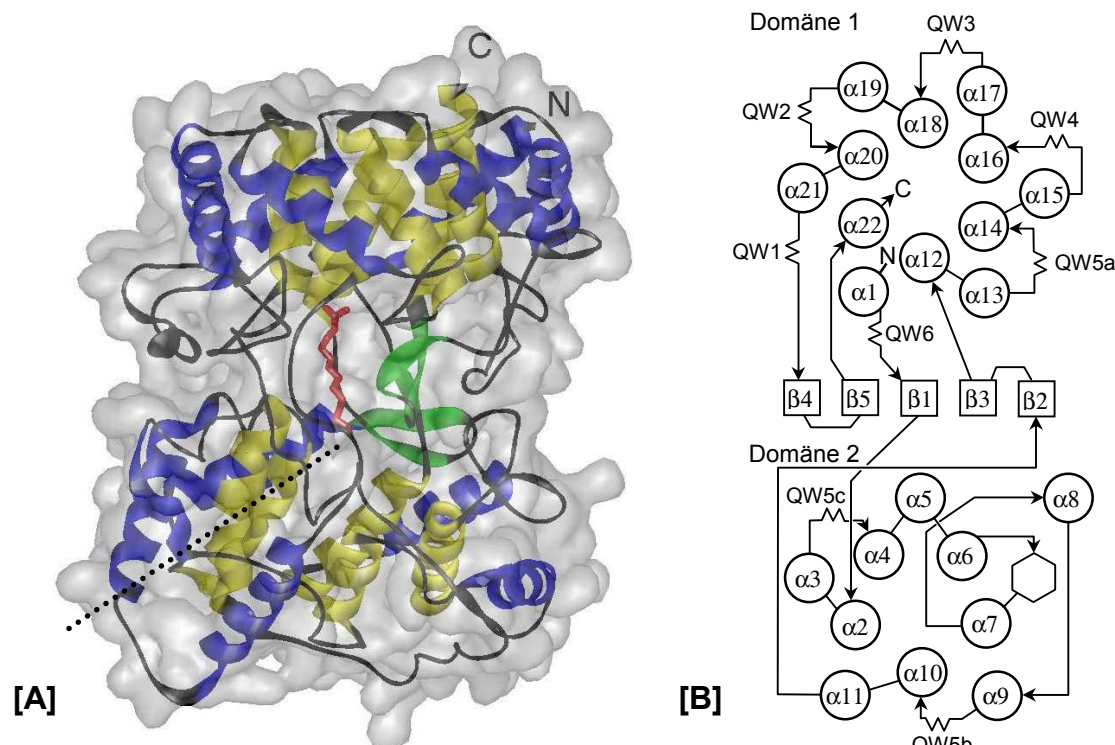


Abbildung 5: Struktur der SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius*. [A] Moleküloberfläche des Proteins mit dem eingezeichneten Verlauf der Aminosäurekette als Ribbonmodell. Blau: äußere α -Helices, gelb: innere α -Helices, grün: β -Sheets, rot: Inhibitor LDAO im aktiven Zentrum im Molekülinnenen. Die gestrichelte Linie markiert die ungefähre Lage des Kanals von der Moleküloberfläche ins aktive Zentrum, N und C markieren die N- bzw. C-Termini des Proteins. [B] das entsprechende schematische Topologiemodell (nach WENDT *et al.*, 1997) der α -Helices (Kreise), 3_{10} -Helix (Sechseck), β -Sheets (Quadrate) und der QW-Motive (Zickzacklinien).

Wie alle anderen Triterpen-Cyclasen ist auch die SHC ein membranassoziiertes Protein. Dabei ist ein hydrophobes Areal auf der Oberfläche der Domäne 2 für die Membraninteraktion verantwortlich. Die dieses Areal umgebende positiv geladenen Aminosäuren verstärken durch ionische Wechselwirkungen mit den sauren Kopfgruppen der Membranlipide die Verankerung des Enzyms in der Membran. Das partielle Eintauchen in die Membran ermöglicht dem Enzym auch den Kontakt mit seinem Substrat, da das hydrophobe Squalen in der Membran gelöst vorliegt. Über einen schmalen Kanal im Zentrum der Membranbindungsstelle hat das Substrat Zugang zum aktiven Zentrum, welches sich als Höhle im Inneren des Proteins befindet (**Abbildung 6**).

Die Cyclisierung von Squalen (bzw. 2,3-Oxidosqualen) gehört zu den komplexesten bekannten Reaktionen, die von einem einzigen Enzym katalysiert werden (COREY *et al.*, 1994). Dies erklärt auch, warum diese Enzyme und ihr Reaktionsmechanismus schon seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschungsarbeiten sind. Schon vor der Aufklärung der Röntgenstruktur der SHC aus *A. acidocaldarius* konnten wichtige Erkenntnisse über

grundlegende Eigenschaften dieser Triterpen-Cyclasen gewonnen werden. Durch die gezielte Mutagenese von Aminosäuren, die bei mehreren Triterpen-Cyclasen konserviert sind, konnten einige identifiziert werden, deren Austausch drastische Auswirkungen auf die Enzymaktivität hatte (FEIL *et al.*, 1996; COREY *et al.*, 1996, 1997a, 1997b). Diese Ergebnisse lieferten erstmals Hinweise auf potentielle Aminosäuren des aktiven Zentrums dieser Cyclasen. Durch Markierungsexperimente mit Squalen- bzw. Oxidosqualen-analogen Inhibitoren konnten weitere wichtige Aminosäuren identifiziert werden (ABE & PRESTWICH, 1994, 1995; ABE *et al.*, 1997). Zudem lieferten Inhibitor-Experimente (COREY *et al.* 1995; COREY & CHENG, 1996; COREY *et al.* 1997b) und die Isolierung und Charakterisierung tetra- und pentacyclischer Nebenprodukte der SHC aus *A. acidocaldarius* (PALE-GROSDEMANGE *et al.*, 1998) wichtige Erkenntnisse über den Reaktionsmechanismus. Sie machten deutlich, daß die Cyclisierungsreaktion über einzelne intermediäre carbokationische Zwischenstufen verläuft.

Damit die Reaktion der Squalen-Cyclisierung erfolgreich ablaufen kann, muß das aktive Zentrum des Enzyms eine Reihe von Eigenschaften besitzen, um diese komplexen Aufgaben auch erfüllen zu können. Hierzu gehören die Faltung des in das aktive Zentrum hineindiffundierten Squalens in die richtige Konformation, die Initiierung der Cyclisierungsreaktion durch Protonierung, die Stabilisierung der intermediären Carbokationen und eine gezielte Termination der Reaktion. Schließlich müssen die bei der Reaktion gebildeten cyclischen Verbindungen wieder aus dem Inneren des Enzyms herausgelangen können, damit das aktive Zentrum für die nächste Cyclisierung zur Verfügung steht. Durch die inzwischen bekannte dreidimensionale Struktur des aktiven Zentrums der SHC (**Abbildung 6**) ist es nun möglich, die aus früheren Versuchsergebnissen abgeleiteten Vorstellungen über den Reaktionsmechanismus zu überprüfen und gegebenenfalls zu modifizieren. Durch die Auswertung der Röntgenstrukturdaten und anderer Daten konnte die bisher umfassendste Hypothese über den Reaktionsmechanismus der Squalen-Cyclisierung postuliert werden (WENDT *et al.*, 1997, 1999; WENDT & SCHULZ, 1998).

Demnach diffundiert Squalen in den langgestreckten Hohlraum des aktiven Zentrums im Proteininneren. Der obere und untere Abschluß dieser Höhle wird überwiegend von polaren Aminosäuren gebildet, während der mittlere Abschnitt mit hydrophoben Resten – darunter ungewöhnlich viele aromatische Aminosäuren – ausgekleidet ist (oben bzw. unten bezieht sich auf eine räumliche Orientierung des Moleküls wie in **Abbildung 5A**). Man nimmt an, daß hier das Squalen in die für die Cyclisierung zu Hopen erforderliche all-prä-Sessel-Konformation vorgefaltet wird. Die polaren Reste im oberen Bereich des aktiven

Zentrums werden für die Initiierung der Cyclisierung verantwortlich gemacht, die durch Protonierung der ersten Squalendoppelbindung durch D376 eingeleitet wird. Unterstützt wird dies durch die benachbarten und über Wasserstoff- und Salzbrücken verbundenen Aminosäuren D374, D377 und H451. Alle drei Aspartatreste sind Teil des konservierten Sequenzmotivs DXDDTA, dessen Bedeutung für die Enzymaktivität schon früher nachgewiesen wurde (FEIL *et al.*, 1996; COREY *et al.*, 1997a).

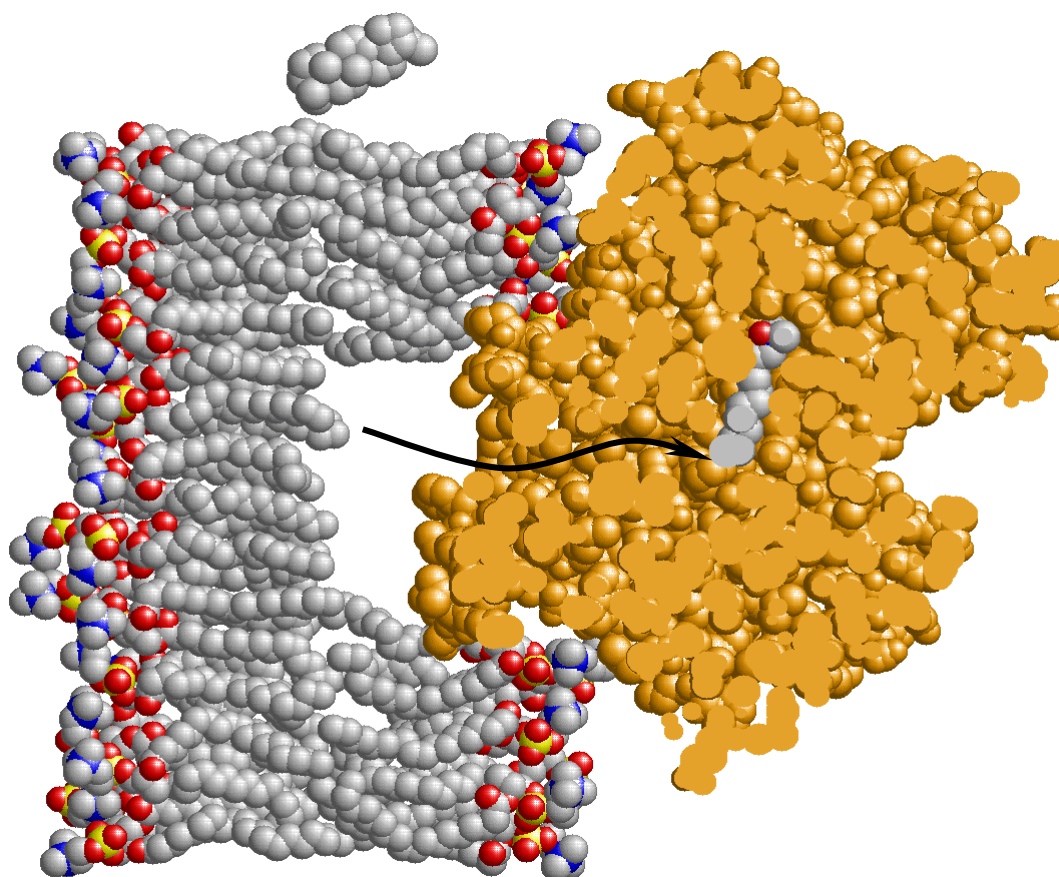


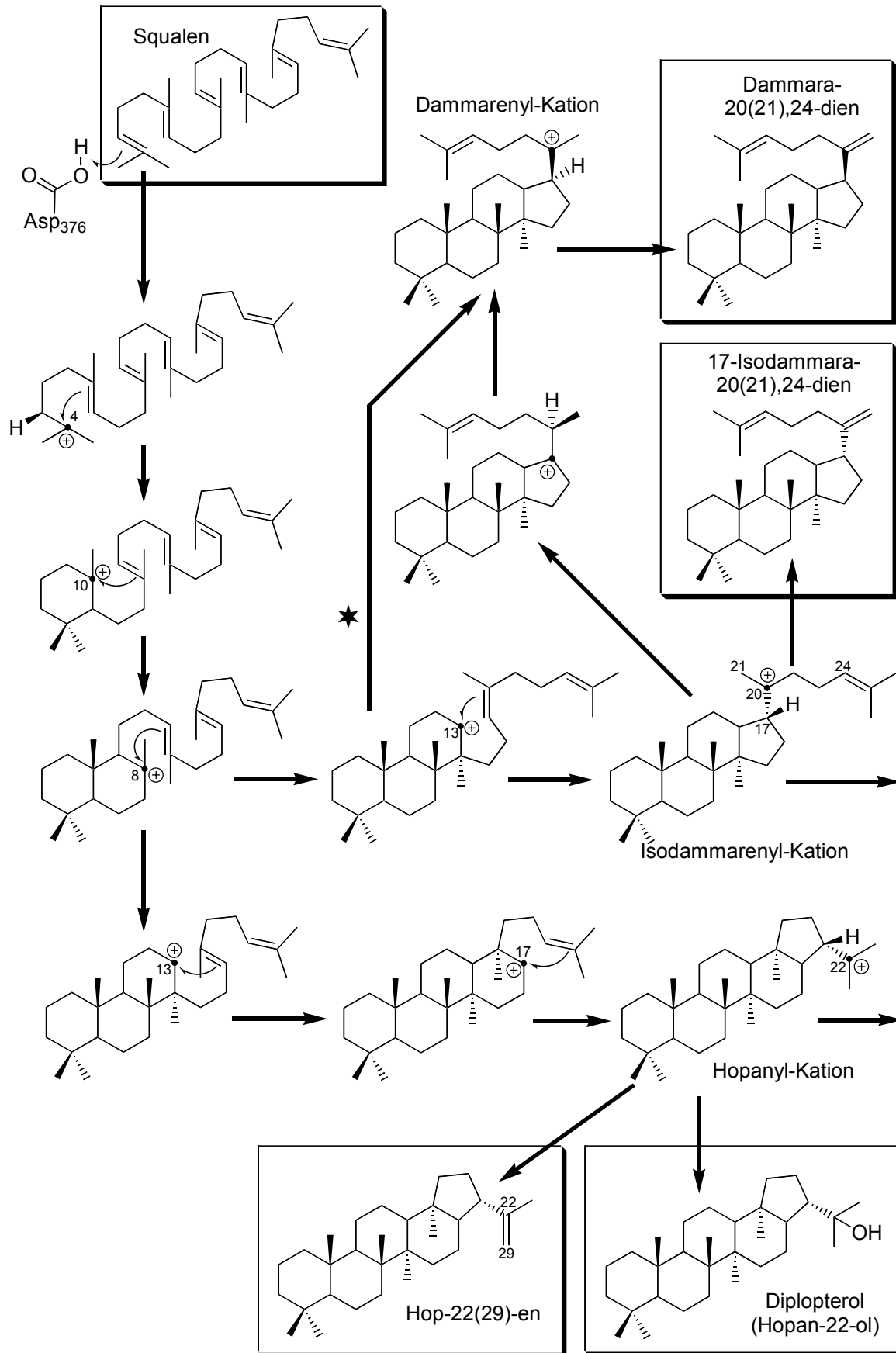
Abbildung 6: Modell für die Bindung der SHC von *A. acidocaldarius* an eine Lipidmembran. Links das Modell einer Lipiddoppelmembran (HELLER *et al.*, 1993); rechts die SHC, die mit einem hydrophoben Bereich in die Membran eintaucht und so angeschnitten wurde, daß das aktive Zentrum im Molekülinneren mit dem Inhibitor LDAO (grau) und der Kanal zur Moleküloberfläche freigelegt wurde. Der Pfeil zeigt den Weg des Substrats Squalen aus der Membran durch den Kanal in das aktive Zentrum hinein. Das „Loch“ in der Membran vor der Kanalöffnung ist *in vivo* durch Acylketten der Fettsäuren sowie Squalen und dessen Cyclisierungsprodukte ausgefüllt. Oben zum Größenvergleich ein Hopenmolekül.

Durch die Protonierung der ersten Doppelbindung des Squalens entsteht ein Carbokation, welches durch Umlagerung von Bindungen und damit einhergehender Cyclisierungen durch das Molekül wandert (**Abbildung 7**). Die bei der Reaktion auftretenden intermediären, reaktiven Carbokationen müssen durch das Enzym stabilisiert werden, um unerwünschte Nebenreaktionen zu verhindern. Hierfür kommen vor allem die zahlreichen aro-

matischen Aminosäuren im mittleren Abschnitt des aktiven Zentrums in Betracht. Durch Wechselwirkungen mit ihrem π -Elektronensystem sind sie in der Lage, Carbokationen zu stabilisieren (JOHNSON *et al.*, 1987; DOUGHERTY, 1996). Auch die ungepaarten Elektronenpaare der Hydroxylgruppen der Tyrosinreste könnten stabilisierend wirken. Durch den hydrophoben Charakter verhindern die aromatischen Aminosäuren zudem, daß Wassermoleküle mit den intermediären Carbokationen in Kontakt kommen. Auf diese Weise wird eine vorzeitige Termination der Cyclisierungsreaktion verhindert. Aufgrund ihrer Lage im aktiven Zentrum dürften die aromatischen Aminosäuren W312, W489 und F365 für die Stabilisierung der Carbokationen C-4⁺, C-10⁺ und C-8⁺ verantwortlich sein (zur Numerierung der Carbokationen siehe **Abbildung 7**). Die sauren Reste D374 und D377 sowie die Hydroxylgruppen von Y609 und Y612 dürften ebenfalls an der Stabilisierung beteiligt sein. Bei den nächsten Carbokationen dürften diese Funktionen die Reste W169 (C-13⁺), F601 (C-18⁺) und F605 (C-22⁺) übernehmen (WENDT, 1997; WENDT *et al.*, 1999).

Nach dem Reaktionsstart im oberen und der Cyclisierungen im mittleren Bereich des aktiven Zentrums kommt es abschließend im unteren polaren Abschnitt zur Termination der Reaktion. Dazu muß die positive Ladung aus dem Substratmolekül eliminiert werden. Bei der Hopfenbildung geschieht dies durch Abspaltung eines Protons vom Hopanyl-Kation. Jedoch liefert die Röntgenstruktur keinen Hinweis auf eine geeignete Aminosäure an dieser Position, die die Funktion einer katalytischen Base übernehmen könnte. Aus diesem Grund wird vermutet, daß diese Funktion von einem polarisierten Wassermolekül übernommen wird. Die Polarisierung wird durch weitere Wassermoleküle erreicht, die durch Wasserstoffbrücken zwischen den Aminosäuren E45, E93, R127 und Q262 festgehalten werden. Dagegen kommt es zur Bildung des schon lange bekannten Nebenprodukts Diplopterol (SECKLER & PORALLA, 1986), wenn das erste Wassermolekül stattdessen als Hydroxyl-Ion auf das Hopanyl-Kation übertragen wird

Aus massenspektrometrischen Analysen der Produkte der SHC ist schon länger bekannt gewesen, daß neben Hopfen und Diplopterol weitere Nebenprodukte in sehr geringer Menge gebildet werden, die aus diesem Grund lange nicht identifiziert werden konnten (FEIL, 1997). Inzwischen gelang es jedoch, einige der häufigsten Nebenprodukte, die mengenmäßig jeweils 1 - 2 % des gebildeten Hopfens ausmachen, zu isolieren und zu charakterisieren (PALE-GROSDÉMANGE *et al.*, 1998; **Abbildung 7**). Mit dem Nachweis dieser Nebenprodukte konnte gezeigt werden, daß eine vorzeitige Termination der Cyclisierungsreaktion, die zu eben diesen tetracyclischen Verbindungen führt, durch das Enzym nicht vollständig unterdrückt werden kann.



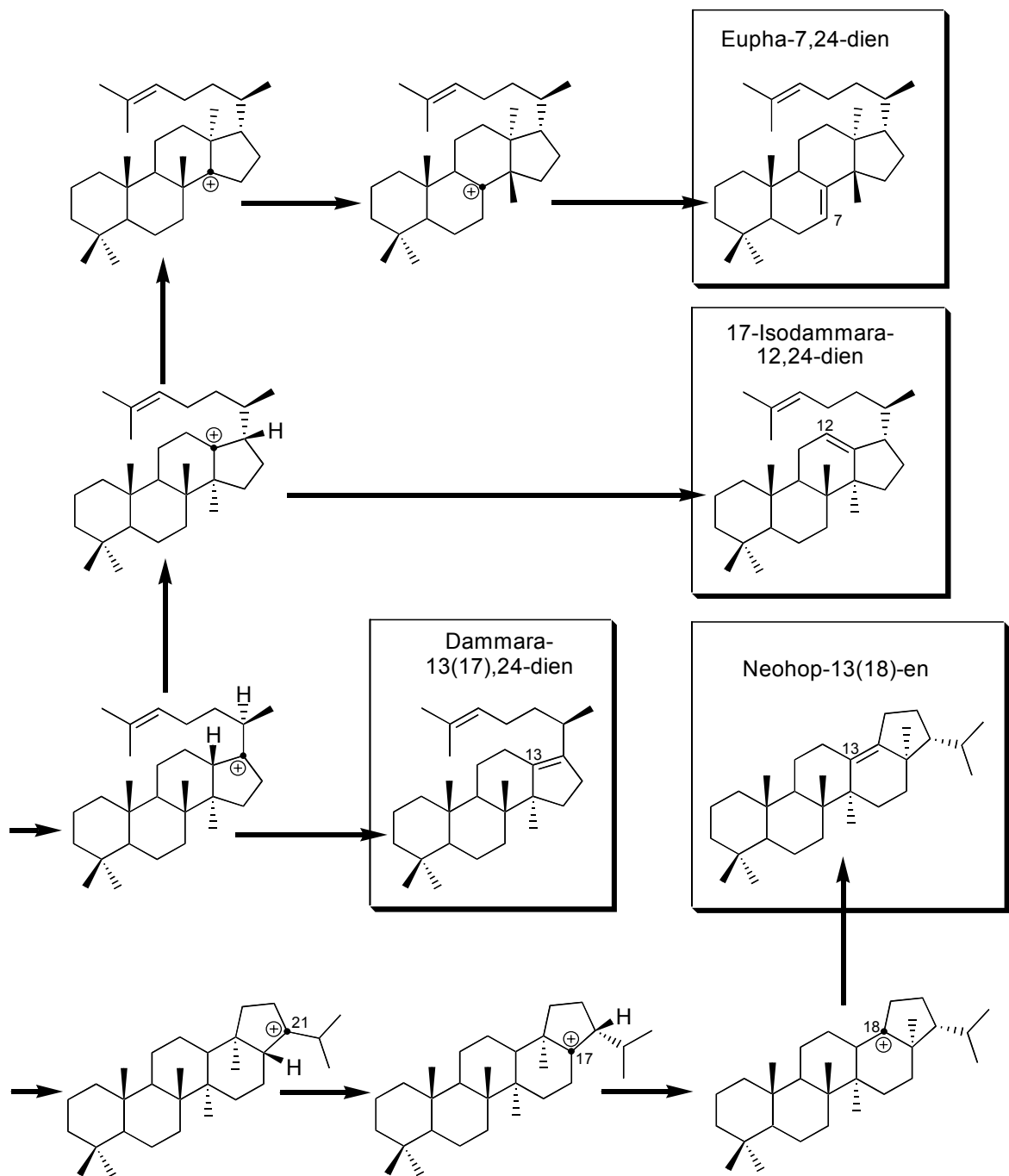


Abbildung 7: Reaktionsmechanismus der Squalen-Cyclisierung durch die SHC von *A. acidocaldarius* (verändert nach PALE-GROSDÉMANGE *et al.*, 1998). Ausgehend vom Squalen in der all-*prä*-Sessel-Konformation ist die Cyclisierung zu den beiden Hauptprodukten Hopan und Diplopterol sowie zu den in wesentlich geringeren Mengen gebildeten und bisher charakterisierten Nebenprodukten mit den postulierten Zwischenstufen dargestellt. Aus Platzgründen ist die Seitenkette ab dem Isodammarenyl-Kation um 180° um die C-17/C-20-Bindung gedreht dargestellt. Die Positionen der intermediären Carbokationen sind unter Verwendung der Atomnummerierung im Hopanmolekül angegeben. *: Bei entsprechender Orientierung der Seitenkette kann das C-13-Carbokation auch direkt zum Dammaranyl-Kation ohne Umweg über das Isodammarenyl-Kation cyclisiert werden.

Gleichzeitig konnte damit auch nachgewiesen werden, daß bei der Reaktion der SHC neben der Cyclisierung auch Verschiebungen von Methylgruppen und Protonen vorkommen, wie dies schon länger von den Reaktionen der Oxidosqualen-Cyclasen bekannt ist.

Über den Mechanismus der Produktfreisetzung kann bisher nur spekuliert werden. Aufgrund des hydrophoben Charakters von Hopan ist anzunehmen, daß es wieder in die Cytoplasmamembran zurückgeführt wird. Wie das starre Ringsystem des Hopans dabei durch den engen Kanal aus dem Enzym-Inneren heraustransportiert wird, ist bisher noch nicht geklärt. Eventuell ist eine Erweiterung dieser Engstelle durch mobile Loops des Proteins möglich (WENDT *et al.*, 1999). Hierfür könnte die bei der Cyclisierungsreaktion freiwerdende Energie von ca. 200 kJ/mol einen Beitrag leisten (WENDT *et al.*, 1997).

Dies alles macht deutlich, daß die Aufklärung der Röntgenstruktur der SHC von *A. acidocaldarius* einen wichtigen Meilenstein in der Erforschung der Funktion von Triterpen-Cyclasen darstellt, aber damit noch längst nicht alle Fragen gelöst sind. Dazu gehören zum Beispiel die bei der Reaktion ablaufenden dynamischen Prozesse, die unter anderem zu einer Verkürzung des Squalenmoleküls während der Cyclisierungsreaktion führen. Inzwischen wurde auch die Vorstellung geäußert, daß das Substrat während der Reaktion seine Position im aktiven Zentrum verändern könnte (WENDT *et al.*, 1999).

Bisher liegen noch keine Strukturdaten eines Cokristalls von SHC und Squalen oder einem der bekannten Produktmoleküle vor, sodaß die genaue Lage dieser Moleküle zu den einzelnen Aminosäuren des aktiven Zentrums noch nicht eindeutig geklärt ist. Hier konnten in der letzten Zeit mit der Aufklärung der Röntgenstruktur der SHC mit verschiedenen squalenanalogen Inhibitoren im aktiven Zentrum einige Fortschritte erzielt werden (LENHART *et al.*, 2002, LENHART *et al.*, 2003, REINERT *et al.*, 2004).

Die vorhandenen Strukturdaten ermöglichen es, die Funktion der Aminosäuren des aktiven Zentrums der SHC bei der Cyclisierungsreaktion nun durch gezielte Mutagenese zu erforschen. Hier gilt es herauszufinden, wie die einzelnen Aminosäuren durch ihren Einfluß auf die Substratfaltung, die Stabilisierung der intermediären Carbokationen oder die Termination die Art der gebildeten Reaktionsprodukte mitbestimmen. Kann die Produktspezifität auf wenige Aminosäuren begrenzt werden, dann reichen geringe Veränderungen bei diesen Aminosäuren aus, um zu deutlich veränderten Reaktionsprodukten zu gelangen. So konnte inzwischen durch den Austausch einer einzigen Aminosäure z. B. eine Lupeol-Cyclase in eine β -Amyrin-Cyclase und umgekehrt eine β -Amyrin-Cyclase in eine Lupeol-Cyclase umgewandelt werden (KUSHIRO *et al.*, 2000). Ebenso konnte eine Cycloartenol-Cyclase durch einen AS-Austausch in eine Lanosterol-Cyclase umgewandelt werden (HART *et al.*,

1999; HERRERA *et al.*, 2000; WU & GRIFFIN, 2002; MEYER *et al.*, 2002; SEGURA *et al.*, 2002). Diese Ergebnissen tragen auch dazu bei, die Evolution dieser Enzyme, die für die Vielfalt der bekannten Triterpen-Verbindungen verantwortlich ist, besser zu verstehen. Gleichzeitig eröffnen diese Kenntnisse auch die Möglichkeiten, durch die Konstruktion chimärer Proteine oder durch gezieltes „protein engineering“ neue Enzyme mit veränderten oder neuen Eigenschaften zu konstruieren. So konnten inzwischen chimäre Sesquiterpen-Cyclasen durch Exon-Kombination der Gene der 5-*epi*-Aristolochen-Cyclase aus *Nicotiana tabacum* und der Vetispiradien-Cyclase aus *Hyoscyamus muticus* konstruiert werden (BACK & CHAPPELL, 1996). Diese Enzyme produzieren sowohl 5-*epi*-Aristolochen als auch Vetispiradien. Auch erste chimäre Triterpen-Cyclasen sind inzwischen beschrieben worden. Hierfür wurden durch „domain shuffling“ Teile des Gens der β -Amyrin-Cyclase von *Panax ginseng* und der Lupeol-Cyclase von *Arabidopsis thaliana* kombiniert. Im Aktivitätstest des exprimierten Genkonstruktes konnten sowohl β -Amyrin als auch Lupeol als Produkte nachgewiesen werden (KUSHIRO *et al.*, 1999a).

1.5 Ziel der Arbeit

Zu Beginn der Arbeit war die 3D-Struktur der SHC von *Alicyclobacillus acidocaldarius* noch unbekannt. Deshalb sollten N- und C-terminale Deletionsmutanten der SHC konstruiert werden, um damit die für die Enzymaktivität notwendige minimale Proteingröße festzustellen. Durch diese Deletionen sollte gleichzeitig auch die Zahl der potentiellen Aminosäuren des aktiven Zentrums der SHC eingeschränkt werden, damit diese Aminosäuren dadurch leichter identifiziert und dann näher analysiert werden könnten.

Da noch im Verlauf dieser Arbeit mit der Aufklärung der 3D-Struktur der SHC gerechnet werden konnte, sollten diese Informationen dann dazu genutzt werden, gezielt die so identifizierten Aminosäuren des aktiven Zentrums durch Alanin zu ersetzen. Sollten diese Mutationen Auswirkungen auf die Enzymaktivität und das Produktspektrum haben, dann sollten diese Veränderungen auch Rückschlüsse auf die Funktion dieser Aminosäuren im aktiven Zentrum bei der Substratfaltung und der Stabilisierung intermediärer Carbokationen ermöglichen und damit zu einem besseren Verständnis des katalytischen Mechanismus der SHC führen.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

Soweit nicht anders angegeben, wurden analysenreine Chemikalien der Firmen Merck AG, Darmstadt und Roth, Karlsruhe verwendet.

AGS, Heidelberg:

Joey Gel casting System, Vertical Gel Electrophoresis System

Applied Biosystems, Weiterstadt:

Oligonukleotide

Appligene, Heidelberg:

Ethidiumbromid

Bachofer, Reutlingen:

Spannungsquellen, pH-Meter, UV-Tisch

Boehringer Mannheim, Mannheim:

T4-DNA-Ligase, Shrimps Alkalische Phosphatase

Branson Sonic Power Comp., Dunbury, CT, USA:

Branson Sonifer B-12

Clontech, Heidelberg:

Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit

Difco, BD, Heidelberg:

Bacto-Trypton, Hefeextrakt

DuPont de Nemours, Bad Homburg:

Sorvall Zentrifuge RC2-B

Eppendorf, Hamburg:

Photometer 1101M

Eurogentec, Seraing, Belgien:

Oligonukleotide, Restriktionsendonucleasen

Fluka, Neu-Ulm:

Cross-linker, Bactoagar

Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe:

LB Broth Base, LB Agar, Agarose

Gilson, ABIMED Analysentechnik, Langenfeld:

MicroFraction Collector 203, Miniplus 2 Peristaltikpumpe

Greiner Labortechnik, Frickenhausen:

Halbmicroküvetten

Heraeus Instruments, Hanau:

Biofuge 13, Biofuge 22R

Isco, Lincoln, NE, USA:

UV-Monitor UA-5, Type 6 Optical Unit

J&W Scientific, Folsom, CA, USA:

DB5-Kapillarsäule (30 m; 0,32 mm i.D.; 1,0 µm Schichtdicke)

LKB, Freiburg:

Multiphor NovaBlot 2117-250

Macherey-Nagel, Düren:

Nucleobond AX-100, NucleoSpin-Kit, GC/MS-Säule Optima-5-MS (15 m, 0,25 mm i.D., 0,25 µm Schichtdicke)

MBI Fermentas, St. Leon-Rot:

Restriktionsendonucleasen, T4 DNA Ligase, T4 DNA Polymerase, T4 Polynucleotid Kinase, 100/1000 bp DNA Ladder-Mix,

Merck, Darmstadt:

Trypsin, Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz, DC-Fertigplatten Kieselgel 60

Millipore, Eschborn:

Micropure-EZ Enzyme Remover

MWG-Biotech GmbH, Ebersberg:

Hybaid-PCR-Gerät

New England Biolabs, Schwalbach/Taunus:

Restriktionsendonucleasen, T4 DNA Ligase, T4 DNA Polymerase, T4 Polynucleotid Kinase, λ -BstE II-Marker,

peqlab, Erlangen:

IPTG, Agarose-Gelelektrophoresekammern

Pharmacia, Freiburg i. Br.:

E. coli JM105, pUC18, pUC19, pKK223-3, A.L.F.TM DNA Sequencer, Auto-ReadTM Sequencing Kit, Oligonukleotide, ATP, DTT, T7 DNA Polymerase, Q Sepharose HP, Sephacryl S-300 HR, Superdex 200 HR, FPLC Basic System, Low Molecular Weight Calibration Kit, High Molecular Weight Calibration Kit, High Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kit, GeneQuant Photometer

Polaroid, Offenbach:

Polaroidfilm 667

Promega, Mannheim:

E. coli BMH 71-18 *mutS*

Qiagen, Hilden:

pQE-8, Qiaex DNA Gel Extraction Kit, Ni²⁺-NTA-Agarose, Ni²⁺-NTA-Spin Kit

Roth, Karlsruhe:

RotiphoreseGel 30, Roti®-Load Proteinauftragspuffer, IPTG, RNase, TRIS, SDS, X-Gal

Schleicher & Schuell, Einbeck:

Einmal-Sterilfilter 0,2 µm

Serva, Heidelberg:

Ampicillin Na-Salz, Tetracyclin, Triton X-100, Serva Blue Vertical 100/C-Gelelektrophoresekammer, Serva Blau R

Shimadzu Deutschland, Duisburg:

Gaschromatograph GC-9A, Integrator C-R3A Chromatopac

Sigma-Aldrich Chemie, Deisendorf:

BSA, DMSO, DNase, Lysozym, Squalen, PMSF, PEG 8000

Spectronic Instruments, Inc., Rochester, NY, USA:

French Pressure Cell Press

Supelco, Sigma-Aldrich Chemie, Deisendorf:

Genelute Agarose Spin Column

United States Biochemical Corp. (USB), Cleveland, OH, USA :

dATP, dCTP, dTTP, dGTP

2.2 Bakterienstämme, Plasmide und Oligonukleotide

2.2.1 *Escherichia coli* Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
JM83	<i>F</i> , <i>ara</i> Δ(<i>lac-proAB</i>), <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^r), [<i>φ80d lac</i> Δ (<i>lacZ</i>) <i>M15</i>], <i>thi</i>	YANISH-PERRON <i>et al.</i> , 1985
JM101	<i>F'</i> <i>traD36 lacI</i> ^q Δ(<i>lacZ</i>) <i>M15 proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ / <i>supE thi</i> Δ (<i>lac-proAB</i>)	YANISH-PERRON <i>et al.</i> , 1985
JM105	<i>thi</i> , <i>rpsL</i> (<i>Str</i> ^r), <i>endA</i> , <i>sbcB15</i> , <i>hsdR4</i> , <i>supE</i> , <i>D(lac-proAB)</i> , <i>F'</i> [<i>traD36</i> , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZDM15</i>]	YANISH-PERRON <i>et al.</i> , 1985
DH5α	<i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (<i>r</i> _k ⁻ <i>m</i> _k ⁺), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>subE44</i> , <i>thi-1</i> , Δ(<i>lacZYA-argFV169</i>), <i>φ80d lacZΔ'M15</i> , <i>F</i> , <i>λ</i> ⁻	HANAHAN, 1983
BMH 71-18 <i>mutS</i>	<i>supE</i> , <i>thi-1</i> , Δ(<i>lac-proAB</i>), <i>F'</i> [<i>proAB</i> ⁺ , <i>lac I</i> ^q <i>ZΔM15</i>], <i>mutS::Tn10</i>	ZELL & FRITZ, 1987

2.2.2 Klonierungsvektoren

Vektor	Resistenz / Größe	Referenz
pUC18	Amp ^r , 2686 bp	YANISH-PERRON <i>et al.</i> , 1985
pUC19	Amp ^r , 2686 bp	YANISH-PERRON <i>et al.</i> , 1985
pQE-8	Amp ^r , 3,4 kb	QIAGEN
pKK223-3	Amp ^r , 4584 bp	BROSIUS & HOLY 1984

2.2.3 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
PCyc	pCyc mit N-terminalem His ₆ -tag	FEIL (1996)
pCyc-DelN1	pCyc mit Deletion der Aminosäuren A2 - E7	diese Arbeit
pCyc-DelN2	pCyc mit Deletion der Aminosäuren A2 - N39	diese Arbeit
PKSHC	SHC über <i>EcoR I/Pst I</i> in pKK223-3	WENDT (1994)
pUC-CycC	<i>Xba I/Sac I</i> -Fragment aus pKSHC in pUC18	diese Arbeit
pUC-CycD	<i>Sac I/BamH I</i> -Fragment aus pKSHC in pUC18	diese Arbeit
pUC-CycE	<i>BamH I/Pst I</i> -Fragment aus pKSHC in pUC18	diese Arbeit
pUC-CycDE	<i>Sac I/Pst I</i> -Fragment aus pKSHC in pUC18	diese Arbeit
pUC-CycD420	pUC-CycD mit Y420A-Mutation	diese Arbeit
pUC-CycD451	pUC-CycD mit H451A-Mutation	diese Arbeit

Plasmid (Forts.)	Beschreibung	Herkunft
pUC-CycD489	pUC-CycD mit W489A-Mutation	diese Arbeit
pUC-CycE601	pUC-CycE mit F601A-Mutation	diese Arbeit
pUC-CycDE420	<i>Sac I/Hind III</i> –Fragment mit Y420A-Mutation aus pUC-CycD420 in pUC-CycDE	diese Arbeit
pUC-CycDE451	<i>Sac I/Pst I</i> -Fragment mit H451A-Mutation aus pUC-CycD451 in pUC-CycDE	diese Arbeit
pUC-CycDE489	<i>Sac I/Pst I</i> -Fragment mit W489A-Mutation aus pUC-CycD489 in pUC-CycDE	diese Arbeit
pUC-CycDE601	<i>Sac II/Pst I</i> -Fragment mit F601A-Mutation aus pUC-CycE601 in pUC-CycDE	diese Arbeit

2.2.4 5'-Fluorescein-markierte Sequenzierprimer

Primer	Sequenz
M13 Universal	f-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT
M13 Reverse	f-CAGGAAACAGCTATGAC
seq1	f-GTCTCCACGAGGTATTGC
seq2	f-GCCGTAGAGGTAATTGAC
seq3	f-CGACAATCCAGCGGAATC
seq4	f-CGACATGACGCAGCATCC
AaSeq1	f-CTTCTGAGCAACGTCACGATGGAAG
AaSeq2	f-GAGAATCTTGAGGCCGATGAG
PKKcycN	f-GCTGTTGACAATTAATCATC
PKKcycC	f-GAAGTTCTCGTAGTGGCTCC

In den nachfolgenden Primersequenzen sind Restriktionsschnittstellen durch Unterstreichungen hervorgehoben. Das entsprechende Restriktionsenzym ist in der letzten Spalte der Tabelle angegeben. Erfolgreich mutierte Klone können durch Restriktionsverdau mit diesem Enzym wegen der zusätzlich eingefügten bzw. durch stille Mutation zerstörten Schnittstelle anhand des veränderten Restriktionsfragmentmusters erkannt werden. Bei den Selektionsprimern schneidet das angegebene Enzym Wildtyp-DNA, nicht jedoch die bei der Mutagenese durch den Selektionsprimer veränderten Plasmide. Bei den Mutagene-

seprimern sind die Codons der gegen Ala ausgetauschten AS grau unterlegt. Bei den Deletionsprimern kennzeichnet ein ↓ die Position der eingeführten Deletionen.

2.2.5 Mutageneseprimer

Primer	Sequenz	Enzym
DelN1	CACCATCACCATCAC↓GCGCCAGCCTACGCGCGGAC	<i>Nae</i> I
DelN2	CACCATCACCATCAC↓GTGACGATGGAAGCGGAG	<i>Eco</i> 72 I
DelC1	CCGCCACGTGTTTCCG↓TGAGGCCTGCGATGGGATCTG	<i>Stu</i> I
DelC2	ATAAATAAGCTTGGATC↓CGGAAACACGTGGCGGTACA	<i>Hind</i> III <i>Bam</i> H I
DelC3	GACGGCGGCTGGGAT↓TAATAGTGAGCTCGTACTACACCGGCAC	<i>Sac</i> I
Eco153+	CGCCATCGAATGAATTCGGAGCGCCAAGA	<i>Eco</i> R I
Bam1846-	CCGCTCGTACGAAGATCCGGCGTACGCGGGTAA	<i>Bam</i> H I
Y420A	GGCGGTTGGGGCGCTGCAGACGTCGACAACACG	<i>Pst</i> I
H451A	AGAGGACCTCACCGCCGGTGCTCGAGTGTTC	<i>Sac</i> II
W489A	AGCTGGTTCGGTCGTGCCGGCGTCAATTACCTC	<i>Ngo</i> M I
F601A	ACTACACGGGCACGGGAGCTCCAGGGGATTTCTAC	<i>Sac</i> I

2.2.6 Selektionsprimer

Primer	Sequenz	Enzym
Switch Oligo	CTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATT	<i>Eco</i> R V
PKKmut	TATTTACACCGCATATTGTGCACTCTCAG	<i>Nde</i> I
pUC-SspIA	AAATGCTTCAATAAACATTGAAAAAGGAAGAG	<i>Ssp</i> I
pUC-SspIB	CTCTTCCTTTTTCAATCTTATTGAAGCATT	<i>Ssp</i> I

2.3 Nährmedien und Kulturbedingungen

2.3.1 Nährmedien

Alle Medien wurden mit H₂O_{deion} angesetzt und 20 min bei 121 °C autoklaviert. Die üblichen Selektionsantibiotika wurden den Medien zu folgenden Endkonzentrationen vor dem Beimpfen zugegeben:

Ampicillin: 100 µg × ml⁻¹ (in H₂O_{deion.} gelöst und sterilfiltriert)

Tetracyclin:	50 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ (in Ethanol gelöst)
• LB Broth Base (Fertigmedium)	20 $\text{g} \times \text{l}^{-1}$
• LB für 20 l-Fermenter (pH 7,0):	200 g BactoTrypton 100 g Hefeextrakt 200 g NaCl
• LB Agar (Fertigmedium)	32 $\text{g} \times \text{l}^{-1}$
• M9-Minimalmedium:	
10x-Salz-Stammlösung (500 ml):	30 g Na_2HPO_4 15 g KH_2PO_4 5 g NH_4Cl 2,5 g NaCl 5 ml $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (0,246 $\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)* 0,5 ml $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (0,147 $\text{g} \times \text{ml}^{-1}$)* * getrennt autoklavieren
Glucose-Stammlösung:	0,2 $\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ in H_2O
Thiamin-Stammlösung:	1 $\text{mg} \times \text{ml}^{-1}$ Thiamin-HCl in H_2O , sterilfiltriert
Streptomycin-Stammlösung:	10 $\text{mg} \times \text{ml}^{-1}$ Streptomycinsulfat in H_2O , sterilfiltriert
M9-Flüssigmedium:	10 % Salzstammlösung 2 % Glucosestammlösung 1 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ Thiamin 25 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ Streptomycin
M9-Agar:	wie M9-Flüssigmedium, mit 15 $\text{g} \times \text{l}^{-1}$ Bactoagar

2.3.2 Kultivierung der Zellen

Die Kultivierung der Zellen in Flüssigkultur erfolgte in Reagenzgläsern mit 5 ml Medium, in 500 ml Erlenmeyerkolben (mit Schikane) mit 100 ml Medium bzw. in 2 l Erlenmeyerkolben (mit Schikane und Drahtspirale) mit 750 ml Medium. Die Inkubation erfolgte in einem Schüttler bei 37 °C und 200 Upm. Zur Induktion der SHC-Expression wurde nach einer Inkubationszeit von ca. 6 h den Kulturen IPTG (Endkonzentration 1 mM) zugegeben und diese für weitere 4 h im Schüttler inkubiert. Für Großansätze wurde ein 20 Liter-

Fermenter (37 °C, 100 Upm, Belüftung: $10 \text{ l} \times \text{min}^{-1}$) eingesetzt. Agarplatten wurden im Brutschrank über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Lyophilisierte Zellen von *E. coli* JM105 wurden in 1 ml LB-Medium über Nacht inkubiert und zur weiteren Vermehrung auf M9-Minimalmedium mit Thiamin und Streptomycin überimpft und davon für die Stammhaltung Glycerinkulturen (siehe 2.3.3) angelegt. Transformierte Zellen von *E. coli* JM105 wurden wie die anderen *E. coli* Stämme in LB-Medium kultiviert.

2.3.3 Stammhaltung

Alle Stämme auf Agarplatten wurden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und alle 4 - 6 Wochen auf neue Platten überimpft. Für Glycerinkulturen wurden 1 ml einer Übernachts-Flüssigkultur mit 1,5 ml sterilem Glycerin in Glasröhrchen (Schraubdeckel mit Teflon-dichtung) vermischt und bei -20 °C bzw. -80 °C gelagert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von „mini-prep“ DNA wurde die Boiling-Lysis-Methode (HOLMES & QUIGLEY, 1981) verwendet. Dazu wurden 2 - 4 ml einer Übernachts-Flüssigkultur bzw. 2 ml einer mit 5 ml Saline abgewaschenen Agarplatte abzentrifugiert und das Zellpellet in 250 µl STET-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl einer RNase/Lysozym-Lösung wurde der Ansatz 3 min im Wasserbad gekocht und abzentrifugiert (20 min). Der Überstand wurde in ein neues Cup überführt und 250 µl Ammoniumacetat (5 M) sowie 500 µl Isopropanol zugegeben und erneut zentrifugiert (20 min). Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet 1 - 2 × mit eiskaltem 70 %igen Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und je nach Größe des DNA-Pellets in 50 - 100 µl TE-Puffer gelöst.

STET-Puffer (pH 8,0):	50 mM Tris
	8 % Saccharose [w/v]
	5 % Triton X-100 [w/v]
	50 mM Titriplex
TE-Puffer (pH 7,5):	10 mM Tris
	1 mM Titriplex

RNase/Lysozym-Lösung:	1 mg × ml ⁻¹ RNase
	10 mg × ml ⁻¹ Lysozym
	50 mM Tris (pH 8,0)
Saline:	8 g × l ⁻¹ NaCl
	1 g × l ⁻¹ MgSO ₄ × 7 H ₂ O

DNA für Anwendungen mit höheren Reinheitsansprüchen (Mutagenesen, DNA-Verdau mit „mini-prep“-sensitiven Restriktionsenzymen (z.B. *Nde* I), DNA-Sequenzierungen) wurde mit dem NucleoSpin Kit (2 - 4 ml Kulturvolumen) bzw. mit Nucleobond AX-100 aus 35 - 70 ml Kulturvolumen einer Übernachtskultur nach Anleitung des Herstellers isoliert.

2.4.2 Quantifizierung von DNA

Isolierte Plasmid-DNA wurde im GeneQuant Photometer durch Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 260$ nm quantifiziert. Für die Messung wurden 0,5 - 1 μ l des DNA-Isolates eingesetzt und mit H₂O_{deion.} auf 80 μ l aufgefüllt.

2.4.3 Restriktionsverdau

Plasmid-DNA wurde mit Restriktionsendonucleasen unter Verwendung der mitgelieferten Puffern nach den Herstellerangaben verdaut, wobei die Inkubationszeit in der Regel 1 Stunde betrug. Die zugegebene Enzymmenge wurde unter 5 % des Gesamtvolumens gehalten. Zur Inaktivierung der Restriktionsenzyme wurde anschließend 20 min bei 65 °C inkubiert. Nicht hitzeinaktivierbare Enzyme wurden – soweit notwendig – mit Hilfe von Micropure-EZ Enzyme Remover nach Angaben des Herstellers aus dem Ansatz entfernt.

2.4.4 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4 DNA Polymerase eingesetzt. Der Ligationsansatz mit einem Gesamtvolumen von 10 μ l wurde für maximal 16 Stunden im Kühlschrank inkubiert. Vor der Weiterverwendung wurde die Ligase durch Inkubation des Ansatzes für 10 min bei 65 °C inaktiviert.

2.4.5 Herstellung kompetenter Zellen

Kompetente Zellen wurden mit einer modifizierten Methode nach CHUNG *et al.* (1989) hergestellt. Dazu wurden 100 ml LB mit einer Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD ($\lambda = 578$ nm) von $0,5 \pm 0,03$ im Schüttler inkubiert. Die Kultur wurde anschließend mit Eis schnellstmöglich heruntergekühlt, weitere 20 min auf Eis inkubiert und in einer vorgekühlten Zentrifuge abzentrifugiert (4 °C, 5 min, $1.200 \times g$). Die Zellen wurden in 10 ml eiskaltem, sterilem TSS-Puffer resuspendiert, zu je 200 μ l aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

TSS-Puffer (pH 6,5):	85 % LB-Medium [w/v]
	10 % PEG 8000 [w/v]
	5 % DMSO [v/v]
	50 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$

2.4.6 Transformation

Für die Transformation wurden 90 μ l der kompetenten Zellen verwendet und mit 10 μ l DNA-Lösung (Ligationsansatz oder Restriktionsverdau) 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschritt im Wasserbad (42 °C, 70 s) nochmals für 2 min auf Eis, dann mit 300 bis 500 μ l LB-Medium ca. 50 min im Schüttler inkubiert (Erholungsphase). Anschließend wurden die Kulturen auf den entsprechenden Selektionsplatten mit einem Drigalski-Spatel ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Alternativ erfolgte die Inkubation über Nacht in 5 ml LB-Medium im Schüttler.

2.4.7 Ortsspezifische Mutagenese

Mutationen wurden nach der Methode von DENG & NICKOLOFF (1992) mit dem Transformer™ Site-directed Mutagenesis Kit durchgeführt. Die verwendeten Selektions- und Mutageneseprimer wurden zuerst phosphoryliert (1 μ g DNA, 1 μ l T4 Polynucleotid-Kinase, 2 μ l 10 \times Kinase Puffer mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ auf 20 μ l aufgefüllt und 1 h bei 37 °C inkubiert, danach die Reaktion durch 10 min Inkubation bei 65 °C abgestoppt.

10 \times Kinase Puffer (pH 7,5):	500 mM Tris
	100 mM MgCl_2
	50 mM DTT
	10 mM ATP

Anschließend wurden jeweils 1 μ l der phosphorylierten Primer mit 1 μ g Plasmid-DNA, 2 μ l 10 \times Annealing-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 μ l im Wasserbad 3 min gekocht und auf Eis 5 min abgekühlt.

10 \times Annealing-Puffer (pH 7,5):	200 mM Tris
	100 mM MgCl ₂ \times 6 H ₂ O
	500 mM NaCl

Zur DNA-Synthese wurde diesem Ansatz 3 μ l 10 \times Synthese-Puffer 1 μ l T4 DNA Polymerase und 1 μ l T4 DNA Ligase zugegeben und auf ein Endvolumen von 30 μ l mit H₂O_{deion.} aufgefüllt und 1 - 2 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 70 °C für 5 min abgestoppt.

10 \times Synthese-Puffer (pH 7,5):	100 mM Tris
	20 mM DTT
	10 mM ATP
	5 mM von jedem dNTP

Zur Selektion gegen die nicht mutierte Wildtyp-DNA wurde ein 10 μ l-Aliquot dieser Reaktion mit dem entsprechenden Selektions-Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von 30 μ l bei 37 °C 1 - 2 h verdaut. Danach wurde das Restriktionsenzym wieder hitzeinaktiviert.

Von diesem Restriktionsansatz wurden 10 μ l für die Transformation von *E. coli* BMH 71-18 *mutS* verwendet (siehe 2.4.6) und die Zellen nach der Erholungsphase in 5 ml LB im Schüttler über Nacht bei 37 °C inkubiert. Aus den Zellen wurde die Plasmid-DNA isoliert (siehe 2.4.1), nochmals mit dem Selektions-Restriktionsenzym verdaut und damit *E. coli* JM83 transformiert. Zur weiteren Anreicherung der Mutanten wurden die Schritte Plasmid-Isolierung, Restriktionsverdau und Transformation wiederholt und diesmal die Zellen auf LB-Platten ausplattiert. Zur Identifizierung positiver Klone wurde deren Plasmid-DNA isoliert und mit dem Restriktionsenzym verdaut, dessen Schnittstelle bei der Mutagenese zusätzlich eingeführt bzw. zerstört wurde. Zur Verifizierung der Mutation wurde von entsprechenden Klonen die Plasmid-DNA abschließend sequenziert (siehe 2.4.10).

2.4.8 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten durch Gelelektrophorese wurde ultrareine Agarose (GIBCO) mit einer Agarosekonzentration von 1 % verwendet. Sowohl für die Herstellung der Gele als auch als Laufpuffer wurde TAE-Puffer verwendet (SAMBROOK *et al.*, 1989).

TAE-Puffer (pH 8,2):	40 mM Tris
	1 mM EDTA

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 6× DNA-Probenpuffer versetzt. Nach dem Gellauf wurden die Gele in einer Ethidiumbromidlösung gefärbt, einige Zeit in Leitungswasser entfärbt und auf einem UV-Tisch bei $\lambda = 254$ nm zu Dokumentation mit einer Polaroidkamera fotografiert (Polaroidfilm 667).

6×-DNA-Probenpuffer:	0,25 % Bromphenolblau [w/v]
	0,25 % Xylencyanol [w/v]
	30 % Glycerol [v/v]
	50 mM EDTA

2.4.9 Isolierung von DNA aus Agarose-Gelen

DNA-Fragmente für Ligationen wurden aus Agarose-Gelen mit dem Qiaex Gel Extraction Kit oder mit Hilfe von Genelute Agarose Spin Column isoliert. In beiden Fällen wurde dabei nach den Herstellerangaben vorgegangen.

2.4.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden nach dem Prinzip der Didesoxy-Kettenabbruchmethode (SANGER *et al.*, 1977) mit dem AutoReadTM Sequencing Kit und dem A.L.F.TM DNA Sequencer durchgeführt. Für Sequenzierungen wurde mit NucleoBond AX-100 isolierte DNA verwendet, wobei ca. 10 µg DNA in 8 µl H₂O_{bidest} pro Sequenzierung eingesetzt wurden. Neben den im Kit enthaltenen 5'-Fluorescein-markierten M13 Universal- und M13 Reverse-Primer wurden auch nach eigenen Angaben synthetisierte 5'-Fluorescein-markierte Primer verwendet.

Zusätzlich wurden Sequenzierungen mit M13 Universal-/Reverse-Primern auch von der Firma 4base-Lab GmbH, Reutlingen durchgeführt. Dazu wurden LB-Agarplatten mit dem zu sequenzierenden Klon eingeschickt.

2.4.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde bei den Experimenten zur Konstruktion von C-terminalen Deletionsmutanten der SHC verwendet. Als Template-DNA diente das Plasmid pCyc. Die Primer wurden so konstruiert, daß über eine Restriktionsschnittstelle in der Primersequenz die Umklonierung des PCR-Fragments in einem neuen Vektor möglich wurde. Die PCR-Reaktion erfolgte standardmäßig in einem Volumen von 50 µl und enthielt:

0,1 µg Template-DNA
 100 pmol Primer
 0 bis 3 mM MgSO₄ × 6 H₂O
 je 1 mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP
 1 U ventTM-Polymerase
 5 µl 10× ventTM-Polymerase-Puffer
 0,5 µl BSA
 mit H₂O_{bidest} auf 50 µl auffüllen

Jeder Ansatz wurde mit 50 µl Mineralöl überschichtet. Die Amplifikation erfolgte über 37 Zyklen mit folgendem Temperaturprogramm:

Hitzenaturierung: 1 min 94 °C
 Primerbindung: 1,5 min bei 60 °C
 DNA-Synthese: 3 min bei 73 °C

Abweichend davon dauerte beim 1. Zyklus der Hitzenaturierungsschritt 3 min und beim 37. Zyklus der DNA-Syntheseschritt 5 min.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Western-Blot

Zum immunologischen Nachweis der SHC in Proteinextrakten wurden diese durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Proteine im Semi-Dry-Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen und dort durch eine immunologische Färbereaktion nachgewiesen (TOWBIN *et al.*, 1979; OCHS, 1990). Dazu wurde das Gel 10 min im Kathodenpuffer inkubiert. Für den Transfer wurden auf die Anodenplatte der Blot-Apparatur (LKB) in folgender Reihenfolge 4 Filterpapiere (getränkt in Anodenpuffer I), 2 Filterpapiere (getränkt in Anodenpuffer II), Nitrocellulosemembran, Gel, 6 Filterpapiere (getränkt in Kathodenpuffer) und abschließend die Kathodenplatte aufgelegt.

Kathodenpuffer:	40 mM Aminocaprinsäure in 20% Methanol
Anodenpuffer I:	300 mM Tris-HCl in 20% Methanol
Anodenpuffer II:	25 mM Tris-HCl in 20% Methanol

Der Proteintransfer erfolgte bei konstanter Stromstärke ($0,8 \text{ mA} \times \text{cm}^{-2}$) in etwa 90 min. Anschließend wurde die Nitrocellulosemembran in H_2O gespült und in 0,1 %iger wäßriger Ponceau S-Lösung angefärbt. Die Lage der Banden des Proteinmarkers wurde auf der Membran markiert und diese dann in H_2O wieder entfärbt und dann für die immunologische Färbereaktion verwendet (siehe 2.5.3).

2.5.2 Kolonie-Western-Blot

Für eine schnelle Identifizierung von SHC-exprimierenden Klonen wurde ein Kolonie-Western-Blot mit anschließender immunologischer Färbung durchgeführt. Dafür wurde von den Agarplatten mit den Bakterienkolonien ein Abklatsch auf eine Nitrocellulosemembran hergestellt. Nach 15 min Inkubation der Membran in CHCl_3 -Dämpfen erfolgte die Zell-Lyse über Nacht im Lysepuffer. Nach der Lyse wurde die Membran 3 mal je 30 min mit TNT-Puffer gewaschen und dann für die immunologische Färbereaktion verwendet (siehe 2.5.3).

Lysepuffer (pH 7,8):	100 mM Tris-HCl
	150 mM NaCl
	5 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$
	1,5 % BSA [w/v]
	1 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ DNase I
	40 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ Lysozym
TNT-Puffer (pH 8,0):	10 mM Tris-HCl
	150 mM NaCl
	0,05 mM Tween20

2.5.3 Immunologischer SHC-Nachweis

Die Nitrocellulosemembran nach Western-Blot (siehe 2.5.1) oder Kolonie-Western-Blot (siehe 2.5.2) wurde 30 min mit dem Blocking-Puffer inkubiert und anschließend je 10 min mit PBS- und PBST-Puffer gewaschen. Zum immunologischen Nachweis der SHC wurde

ein polyklonales Anti-SHC-Kaninchenserum (OCHS, 1990) verwendet. Die Inkubation der Membran mit diesem Antiserum (0,1 % [v/v]) erfolgte 2 h bei RT in Hb-PBS-Puffer. Anschließend wurde die Membran 3 mal je 10 min mit PBST-Puffer gewaschen. Für die zweite immunologische Reaktion wurde ein Serum mit Anti-Kaninchen IgG aus der Ziege verwendet, die für die Nachweisreaktion mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt sind. Die Inkubation mit diesem Serum (0,01 % [v/v]) erfolgte ebenfalls 2 h bei RT in Hb-PBS-Puffer. Nichtgebundene Antikörper wurden durch Waschschriffe (3 mal je 10 min) mit TBST-Puffer entfernt. Für die Farbreaktion wurde jede Nitrocellulosemembran im Dunkeln mit 20 ml APP-Puffer inkubiert, dem jeweils frisch angesetzte 50 µl BCIP-Lösung und 100 µl NBT-Lösung zugesetzt wurden. Zum Abstoppen der Farbreaktion wurde die Membran mit H₂O gewaschen und anschließend getrocknet.

Blocking-Puffer (pH 8,0):	TNT-Puffer (siehe 2.5.2) 30 % BSA [w/v]
PBS-Puffer (pH 7,4):	10 mM K ₂ HPO ₄ 135 mM NaCl 5 mM KCl
Hb- PBS-Puffer (pH 7,4):	PBS-Puffer 0,5 % Hb (Schweinehaemoglobin) [w/v]
PBST-Puffer (pH 7,4):	PBS-Puffer 0,05 % Triton X-100 [v/v]
TBST-Puffer (pH 8,0):	10 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 0,05 % Triton X-100 [v/v]
APP-Puffer (pH 9,5):	100 mM Tris-HCl 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ × 6 H ₂ O
NBT-Lösung:	50 mg × ml ⁻¹ Nitroblau-Tetrazolium in 70 % wässriger Dimethylformamidlösung
BCIP-Lösung:	50 mg × ml ⁻¹ 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- phosphat in Dimethylformamid

2.6 Proteinchemische Methoden

2.6.1 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit einem modifizierten Lowry-Test (PETERSON, 1977). Dazu wurden die Proteinlösungen in Einmalküvetten (Schichtdicke 1 cm) mit H₂O auf 500 µl aufgefüllt, mit 500 µl Reagenz I versetzt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 250 µl Reagenz II und weiteren 30 min Inkubation bei RT wurde die Extinktion der Proben im Photometer bei $\lambda = 578$ nm gemessen. Bei jeder Proteinbestimmung wurde mit verschiedenen Konzentrationen einer BSA-Lösung jeweils eine neue Eichgerade erstellt.

Reagenz I:	1 Vol. 0,8 % NaOH
	2 Vol. 5 % SDS
	1 Vol. KTC-Lösung
Reagenz II:	5 Vol. H ₂ O
	1 Vol. Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz
KTC-Lösung:	10 % Na ₂ CO ₃ [w/v]
	0,1 % CuSO ₄ × 5 H ₂ O [w/v]
	0,24 % KNa-Tartrat [w/v]

2.6.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen erfolgte mit einer diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese. Die Konzentration von Acrylamid betrug im Sammelgel 3 % und im Trenngel 10,5 %. Es wurde Gele im Format 10 × 8 cm (Serva Blue) bzw. 16 × 14 cm (Joey Gel Casting System) mit einer Schichtdicke von 1 mm verwendet. Die Proben wurden mit 4× Roti®-Load Proteinauftragspuffer versetzt, im Wasserbad 3 min gekocht, kurz abzentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit einer konstanten Stromstärke von 35 - 45 mA pro Gel durchgeführt (Laufpuffer: 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0,2 % SDS, pH 8,8). Als Molekulargewichtsstandards wurden die Low bzw. High Molecular Weight Calibration Kits verwendet.

2.6.3 Färbung von SDS-Gelen

Die Proteinbanden in den SDS-Polyacrylamidgelen wurden durch Coomassie- bzw. Silberfärbung (BLUM *et al.*, 1987) sichtbar gemacht.

Coomassie-Färbung:

Das Gel wurde mindestens 1 h in der Färbelösung geschüttelt, kurz mit H₂O abgespült und einige Stunden in der Entfärbelösung bzw. in H₂O über Nacht entfärbt.

Färbelösung:	45 % H ₂ O
	45 % Ethanol
	10 % Eisessig
	0,2 % Serva Blau R [w/v]
Entfärbelösung:	45 % H ₂ O
	45 % Ethanol
	10 % Eisessig

Silberfärbung:

Das Gel wurde zuerst mehrere Stunden im Fixier-Lösung geschüttelt. Anschließend wurde 20 min mit mehrmals gewechseltem 20 % Ethanol gewaschen, 1 min in der Imprägnierlösung inkubiert und mehrmals kurz mit H₂O gewaschen. Nach 30 min Inkubation in Silbernitratlösung wurde nochmals kurz mit H₂O gewaschen und das Gel in Sodalösung geschüttelt, bis eine ausreichende Färbung der Proteinbanden erreicht wurde. Zum Abstoppen der Färbung wurde das Gel in eiskalten Fixierer gelegt. Zur Dokumentation wurden die Gele anschließend gewässert, dann mit einem Scanner eingescannt oder zwischen Einmach-Folien eingespannt und mehrere Tage bei Raumtemperatur getrocknet.

Fixier-Lösung:	50 % Methanol
	12 % Eisessig
Imprägnierlösung:	150 ml H ₂ O
	75 µl Na ₂ S ₂ O ₃ [4,3 % in H ₂ O]
	100 µl Formaldehyd [37 %]
Silbernitratlösung:	150 ml H ₂ O
	100 µl Formaldehyd [37 %]
	0,3 g AgNO ₃

Sodalösung:	250 ml H ₂ O
	15 g NaCO ₃
	125 µl Formaldehyd [37 %]
	2,5 µl Na ₂ S ₂ O ₃ [4,3 % in H ₂ O]

2.6.4 Überexpression der SHC in *Escherichia coli*

Zur Überexpression der SHC wurden Vektoren mit IPTG-induzierbaren *lac*- bzw. *tac*-Promotoren verwendet. Die Kulturen wurden nach dem Beimpfen mit der Vorkultur 4 h bei 37 °C inkubiert, bevor IPTG zugegeben wurde (Endkonzentration 1 mM). Danach wurden die Kulturen für weitere 4 - 5 h inkubiert und die Zellen durch abzentrifugieren geerntet.

2.6.5 Zellaufschluß

Der Zellaufschluß rekombinanter *E. coli* Zellen wurde entweder mit der French-Press oder durch osmotischen Schock durchgeführt. Standardmäßig wurden für eine Proteinaufreinigung durch Metallaffinitätschromatographie ca. 3 g Zellen aus 1 l Kulturmedium aufgeschlossen. Bei einer Proteinaufreinigung durch Anionenaustauschchromatographie wurden ca. 6 g Zellen aus 2,3 l Kulturmedium verarbeitet.

Zellaufschluß mit der French-Press:

3 g Zellen (Feuchtgewicht) wurden in 20 ml Puffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂ × 6 H₂O, pH 8,0) resuspendiert und zur Herabsetzung der Viskosität mindestens 50 µl DNase-Lösung (1 µg × ml⁻¹ in 200 mM Tris, pH 8,0) zugegeben. Unter Kühlung mit Eis wurde der Ansatz dreimal hintereinander mit der French-Press aufgeschlossen. Um ein verbessertes Ergebnis zu erzielen, wurde der Zellaufschluß abschließend noch mit Ultraschall behandelt (3 × je 3 min)

Zellaufschluß durch osmotischen Schock:

Die Methode von OCHS (1990) wurde in einer leicht modifizierten Weise eingesetzt. Zuerst wurden 6 g Zellen (Feuchtgewicht; entspricht in der Regel der Ausbeute bei 3 × 750 ml LB-Kulturen) in 45 ml T-Puffer (200 mM Tris, pH 8,0) resuspendiert, dann 11 g Saccharose, 2 ml Tritriplex (0,5 M), 25 mg Lysozym, 50 µl DNase-Lösung (1 µg × ml⁻¹ in 200 mM Tris, pH 8,0) und 0,47 ml PMSF-Lösung (100 mM in Ethanol) zugegeben und über

Nacht im Gefrierschrank bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Zellsuspension wurde aufgetaut, 220 ml $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ zugegeben und auf Eis solange gerührt, bis eine möglichst homogene Durchmischung erreicht wurde. Anschließend wurde unter weiterer Kühlung mit Eis der Zellaufschluß dreimal je 3 min mit Ultraschall behandelt.

Für großvolumige Enzymtests zur Isolierung der Enzymprodukte für die Strukturaufklärung wurde der Zellaufschluß zur Vereinfachung wie folgt durchgeführt: in einer 1-Liter-Schott-Flasche wurden 20 g Zellen mit 90 ml Tris (0,2 M, pH 8,0), 22 g Saccharose, 4 ml Titriplex (0,5 M), 50 mg Lysozym, 100 μl DNase- Lösung ($1\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ in 200 mM Tris, pH 8,0) und 1 ml PMSF-Lösung resuspendiert und eingefroren. Die aufgetaute Suspension wurde mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ auf ein Endvolumen von ca. 500 ml aufgefüllt und ebenfalls mit Ultraschall behandelt.

Nach dem Zellaufschluß wurde der gewonnene Rohextrakt entweder direkt für die Enzymtests (siehe **2.5.10**) verwendet oder für die säulenchromatographische Aufreinigung der SHC (siehe **2.5.9 - 2.5.10**) durch Membranpräparation (siehe **2.5.6**) und Hitzedenaturierung (siehe **2.5.7**) weiter angereichert. Bis zur Weiterverwertung erfolgte die Lagerung des Zellhomogenats bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.6.6 SHC-Anreicherung durch Membranpräparation

Zur Membranpräparation wurde das Zellhomogenat nach dem Aufschluß 60 min bei $40.000 \times g$ abzentrifugiert und der Überstand (Cytoplasma) anschließend verworfen, Das Pellet, bestehend aus innerer und äußerer Zellmembran sowie nicht aufgeschlossenen Zellen, wurde in Triton X-100 haltigem Puffer resuspendiert, um die SHC mit diesem Detergenz aus der Membran herauszulösen (SCHNAITHMANN, 1971). Für die beiden säulenchromatographischen Aufreinigungsmethoden wurden unterschiedliche Solubilisierungspuffer verwendet, in denen das Pellet durch vortexen sowie mit Hilfe eines Potters homogenisiert und resuspendiert wurde.

Membranpräparation für Metallaffinitätschromatographie:

Solubilisierungspuffer (pH 8,0):	50 mM NaH_2PO_4
	300 mM NaCl
	1 % Triton X-100 [v/v]

2.6.8 Thermostabilität der SHC

Um eventuell hitzelabile SHC-Mutanten bei der Aufreinigung durch den Hitzedenaturierungsschritt nicht zu zerstören, wurden vorher mit dem Zellhomogenat Vorversuche zur Thermostabilität des Enzyms unternommen. Dazu wurden 50 µl Aliquots im Wasserbad für 5 und 10 min bei 40, 45, 50, 55, 60 und 65 °C inkubiert und anschließend mindestens 30 min auf Eis abgekühlt. Ausgefällene Proteine wurden abzentrifugiert (30 min, 17.000 Upm) und der Überstand abgenommen. Der Niederschlag wurde in 20 µl H₂O und 8 µl Proteinprobenpuffer resuspendiert. Vom Überstand wurden 20 µl mit 8 µl Proteinprobenpuffer gemischt, alle Proben 3 min im Wasserbad gekocht und auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Auswertung der gefärbten Gelen erfolgte mit der Gel-Densitometrie (siehe 2.8.5). Damit wurde die Temperatur bestimmt, bei der der größte Teil der SHC noch im Überstand gelöst vorlag, die dann bei der Proteinreinigung für den Hitzedenaturierungsschritt verwendet wurde.

2.6.9 Proteinreinigung durch Metallaffinitätschromatographie

Zur Aufreinigung der SHC mit N-terminalem His₆-tag durch Metallaffinitätschromatographie wurde Säulenmaterial und NTA-Agarose mit Ni²⁺ bzw. Cu²⁺ als Metallionen von Qiagen verwendet. Alle Puffer bei dieser Reinigung wurden mit H₂O_{bidest} angesetzt, um störende ionische Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial zu verhindern. Die Säulen wurden nach Herstellerangaben gepackt und mit Phosphatpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 2 mM Imidazol, pH 8,0) äquilibriert. Die Proteinlösung nach dem Hitzedenaturierungsschritt wurde ebenfalls Imidazol zugegeben (2 mM) und auf die Säule aufgetragen. In mehreren Waschschritten wurde die Säule mit dem jeweils 5 bis 10fachen Säulenvolumen gespült. Dem dafür verwendeten Phosphatpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0) wurde 10 % Glycerin und steigende Konzentrationen von Imidazol zugegeben (siehe 3.2.2). Für die Elution der SHC wurde zweimal das 5fache Säulenvolumen Phosphatpuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8,0) mit 30 % Glycerin und 150 mM bzw. 250 mM Imidazol aufgetragen. Der Säulendurchlauf wurde in 2 ml-Fractionen gesammelt und ausgewertet.

2.6.10 Proteinreinigung durch Anionenaustauschchromatographie

Zur Aufreinigung der SHC durch Anionenaustauschchromatographie wurden 75 ml Q Sepharose HP in einer Säule mit 2,5 cm Durchmesser verwendet. Das Säulenmaterial wur-

de zuerst mit 4 M NaCl-Puffer (4 M NaCl, 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂ × 6 H₂O, pH 8,0) gewaschen und anschließend mit NaCl-freiem Waschpuffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl₂ × 6 H₂O, pH 8,0) äquilibriert. Die entgaste Proteinlösung wurde mit einer Geschwindigkeit von 3,5 - 4 ml × min⁻¹ auf die Säule aufgetragen und anschließend solange mit Waschpuffer gespült, bis die UV-Absorption bei $\lambda = 280$ nm wieder die Grundlinie erreicht hatte. Die Elution der SHC erfolgte mit einem stufenlosen NaCl-Gradienten (0 - 400 mM NaCl in 50 mM Tris, 10 mM MgCl₂ × 6 H₂O, pH 8,0). Abschließend wurde die Säule wieder mit dem 4 M NaCl-Puffer gespült. Das Eluat wurde mit einem automatischen Fraktionenkollektor in 8 ml-Fractionen gesammelt. Nach der Proteinbestimmung und SDS-Gel-Auswertung wurden die SHC-haltigen Fraktionen vereinigt, mit 30 % Glycerin versetzt und bei -20 °C gelagert.

2.6.11 Enzymtests

Die Tests zum Nachweis der SHC-Aktivität wurden entweder mit dem Rohextrakt nach Zellaufschluß oder mit dem aufgereinigten Enzym durchgeführt. Zur Solubilisierung von Squalen wurden Triton X-100 oder Taurodeoxycholat als Detergenzien verwendet.

Standardenzymtest nach OCHS (1990):

Squalenlösung: 0,5 mM Squalen
0,1 % [w/v] Triton X-100 oder 2 % [w/v] Taurodeoxycholat
0,1 M Na-Citrat (pH 6,5)

Direkt vor Verwendung der Squalenlösung wurde diese mindestens 3 min mit Ultraschall homogenisiert.

Testansatz: 100 µl Na-Citrat (1 M, pH 4,9)
100 µl Squalenlösung
max. 800 µl Enzymlösung
mit H₂O_{deion} auf 1 ml auffüllen

Die Enzymtest wurden im Heizblock in der Regel 1 h bei 60 °C inkubiert und anschließend die Lipide für die weitere Analyse daraus extrahiert (siehe 2.6.1). Bei den SHC-Mutanten wurde wie schon beim Hitzedenaturierungsschritt eine niedrigere Inkubationstemperatur (50 °C) verwendet. Bei geringer Enzymaktivität wurde über Nacht inkubiert.

200 HR 10/30 Säule zusammen mit dem FPLC Basic System verwendet. Von den Probenlösungen wurden jeweils ca. 100 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 200 µl mit einer Flußrate von $0,5 \text{ ml} \times \text{min}^{-1}$ aufgetragen. Für die SHC wurde wieder über Anionenaustauschchromatographie aufgereinigtes Wildtyp-Enzym verwendet. Die Eichproteine des High Molecular Weight Gel Filtration Calibration Kits wurden im Laufpuffer (50 mM Tris, 10 mM $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, 200 mM NaCl, pH 8,0) gelöst. Die Detektion der UV-Absorption erfolgte wieder bei $\lambda = 280 \text{ nm}$.

2.6.14 Limitierte Proteolyse durch Trypsinverdau

Für Versuche zur limitierten Proteolyse der SHC wurde Trypsin aus Rinderpankreas verwendet. Die Protease wurde in einem Tris/ CaCl_2 -Puffer ($1 \text{ mg Protein} \times \text{min}^{-1}$ in 50 mM Tris, 10 mM $\text{CaCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$, pH 8,0) gelöst. Standardmäßig wurden im Testansatz 35 µg der über Anionenaustauschchromatographie aufgereinigten Wildtyp-SHC mit 10 µg Trypsin gemischt und mit dem Tris/ CaCl_2 -Puffer auf ein Gesamtvolumen von 300 µl aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte auf Eis bzw. bei 37 °C, wobei nach bestimmten Zeitabschnitten Aliquots von jeweils 25 µl entnommen wurden. Durch Zugabe von 1 µl PMSF (100 mM in Ethanol) und 5 µl Protein-Probenpuffer wurde die Reaktion abgestoppt und die Aliquots auf ein SDS-Gel zur Auswertung aufgetragen.

Die Versuche der limitierten Proteolyse mit nachfolgender N-terminaler Ansequenzierung der proteolytischen SHC-Fragmente (siehe **2.5.13**) wurden in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. G.E. SCHULZ, Institut für Organische Chemie und Biochemie, Universität Freiburg i. Br. durchgeführt. Dazu wurden 250 µg gereinigte SHC mit 25 µg Trypsin versetzt und mit Proteolysepuffer (20 mM Tris, 10 mM β -Mercaptoethanol, 0,6 % C_8E_4 [w/v], pH 8,0) auf ein Gesamtvolumen von 250 µl aufgefüllt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C wurde der Proteaseverdau durch Zugabe von Protein-Probenpuffer abgestoppt und der gesamte Ansatz auf mehrere Spuren eines SDS-Gels aufgetragen.

2.6.15 N-terminale Ansequenzierung durch Edman-Abbau

Die im SDS-Gel aufgetrennten proteolytischen SHC-Fragmente (siehe **2.5.14**) wurde nach der Anleitung von WENDT (1994) in einer Plotting-Apparatur auf eine PVDF-Membran übertragen (ca. 1,5 h bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA} \times \text{cm}^{-2}$). Die Membran wurde mit Ponceau S angefärbt, die 45 kDa-Bande des proteolytischen Hauptfragments der SHC aus allen Gel-Spuren ausgeschnitten, mit H_2O entfärbt und zur N-terminalen Ansequenzierung

verwendet. Diese wurde ebenfalls in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. G.E. SCHULZ, Universität Freiburg i. Br. durchgeführt und die beim Edman-Abbau abgespaltenen Aminosäuren durch HPLC identifiziert.

2.7 Lipidextraktion, Reinigung und Analyse

2.7.1 Lipidextraktion aus Enzymtests

Für die Extraktion der Lipide aus den unterschiedlichen Enzymtests wurde die Versuchsvorschrift von OCHS (1990) teilweise modifiziert.

Lipidextraktion aus Standardenzymtests:

Standardenzymtests mit einem Gesamtvolumen von 1 ml wurden durch Zugabe von 2 ml Hexan/Isopropanol (3:2 [v/v]) abgestoppt, auf dem Vortex gemischt, nach der Phasentrennung die organische Phase in ein neues Glas überführt und im Heizblock bei 100 °C eingedampft. Die so isolierten Lipide wurden in 30 µl Hexan/Isopropanol (3:2 [v/v]) gelöst und davon ca. 5 µl zur Analyse in den GC eingespritzt (siehe **2.6.3**).

Lipidextraktion aus Standardenzymtests mit Entfernung des Triton X-100:

Um Triton X-100 aus den Standardenzymtests zu entfernen, wurden die mit Hexan/Isopropanol extrahierten Lipide anschließend über Kieselgel gereinigt. Dazu wurden Pasteurpipetten zur Hälfte mit Kieselgel 60 gefüllt und die in 1 ml Hexan/Ethylacetat (1:1 [v/v]) gelösten Lipide aufgetragen. Zur Elution wurde zwei mal mit je 1 ml dieses Lösungsmittels nachgespült und der Durchlauf in einem Glasröhrchen aufgefangen, wieder im Heizblock getrocknet und für die GC-Analysen verwendet.

Lipidextraktion aus großvolumigen Enzymtests:

Tritonhaltige großvolumige Enzymtests mit einem Gesamtvolumen von ca. 600 ml wurden zuerst mit dem 1,5-fachen Volumen Hexan/Isopropanol (3:2 [v/v]) extrahiert. Nach Phasentrennung im Scheidetrichter wurde die organische Phase abgenommen und die wässrige Phase nochmals mit dem gleichen Volumen Hexan extrahiert. Die Hexanphase wurde mit organischen Phase der ersten Extraktion vereinigt und das Lösungsmittelgemisch im Rotationsverdampfer abgezogen. Für die vollständige Lösung des Rückstands wurde eine entsprechende Menge Hexan/Ethylacetat (1:1 [v/v]) zugegeben. Zur Entfernung des Triton X-100 wurde die Lipidlösung auf eine Kieselgelsäule (2,5 cm Durchmesser, Kieselgelfüllhöhe ca. 10 - 12 cm) aufgetragen und solange mit Hexan/Ethylacetat (1:1 [v/v]) gewaschen, bis das durch die Probe gelbgefärbte Kieselgel wieder entfärbt war. Vom Säulenmaterial

zurückgehaltenes Lösungsmittel wurde mit Druckluft vorsichtig aus der Säule geblasen. Der Säulendurchlauf wurde in einem neuen Kolben aufgefangene und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer abgezogen. Für die GC-Analyse wurden die so extrahierten Lipide wieder in Hexan/Isopropanol (3:2 [v/v]) gelöst.

2.7.2 Lipidtrennung durch Dünnschichtchromatographie

Zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung von Lipiden wurden DC-Fertigplatten (Kieselgel 60, ohne Fluoreszenzindikator, 10 × 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm) eingesetzt. Die aus den Enzymtests mit Hexan/Isopropanol (3:2 [v/v]) extrahierten Lipide (siehe **2.6.1**) wurden auf die DC-Platten aufgetragen und für die Auftrennung wurden zwei verschiedene Lösungsmittel eingesetzt: [1] Chloroform (Laufweite ca. 6 - 7 cm) und [2] Hexan (Laufmittelfront ca. 18 cm). Die Platten wurden getrocknet, zur Detektion der Lipide mit Schwefelsäurereagenz (100 ml H₂SO₄ konz., 2 ml Formaldehyd [37 %]) besprüht und auf einer Heizplatte bei ca. 100 °C entwickelt. Zur Identifikation der aufgetrennten Substanzen wurden entsprechende Referenzsubstanzen mit auf die DC-Platten aufgetragen.

Einzelne Lipide wurden für die Strukturaufklärung aus den Enzymtests der SHC-Mutanten durch verschiedene aufeinanderfolgende DC-Auftrennung in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. ROHMER, Universität Straßburg isoliert. (PALE-GROSDÉMANGE *et al.*, 1999).

2.7.3 Gaschromatographie (GC)

Die Analyse und Identifikation der aus den Enzymtests isolierten Lipide erfolgte durch Gaschromatographie. Als Referenzsubstanzen dienten Squalen, Hopan und Diplopterol.

Gaschromatograph:	Shimadzu GC-9A mit Flammenionisationsdetektor
Säule:	Optima-5-MS-Kapillarsäule (15 m, 0,25 mm i.D., 0,25 µm Schichtdicke)
Trägergas:	Stickstoff
Detektorgase:	Wasserstoff, Druckluft
Temperaturprogramm:	250 °C - 320 °C mit 4 °C × min ⁻¹ , 10 min isotherm 320 °C Injektor- und Detektortemperatur 330 °C
Integrator:	Shimadzu C-R3A Chromatopac
Split:	1 : 10

2.7.4 Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC/MS)

GC/MS-Analysen der Lipidextrakte wurden von G. Nicholson, Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen bzw. in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. ROHMER, Universität Straßburg durchgeführt (TSQ-700-Spektrometer, Finnigan).

2.7.5 NMR-Analysen

Von den isolierten und aufgereinigten Lipiden aus den Enzymtests der SHC-Mutanten wurden zur Strukturaufklärung ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren bei 300 K mit einem WP-400-Spektrometer (Bruker) aufgenommen. Diese Analysen wurden in der Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. ROHMER, Universität Straßburg durchgeführt (PALE-GROSDÉMANGE *et al.*, 1999).

2.8 Computeranalysen

2.8.1 Analyse von DNA- und Proteinsequenzen

Für die Analyse der DNA-Sequenzen wurden die Programme CLONE und ALIGN (Scientific & Educational Software Inc., Durham, NC, USA; <http://www.scied.com>) verwendet. Bei der Konstruktion von Primern für die Mutagenesen kamen die Programme SILMUT (SHANKARAPPA *et al.*, 1992a, 1992b; <http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/ibmpe>) und PRIMER (Scientific & Educational Software Inc., siehe oben) zum Einsatz. Proteinsequenzen wurden mit den Programmen ANTHEPROT 4.0 (<http://antheprot-pbil.ibcp.fr>) und PC/GENE (IntelliGenetics Inc., Mountain View, CA, USA; <http://www.accelrys.com>) analysiert. Sequenzalignments wurden mit CLUSTALX 1.81 (THOMPSON *et al.*, 1997; <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/ClustalX/Top.html>) erzeugt und für die Darstellung mit BOXSHADE 3.31 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) formatiert. Für die Darstellung der aus den Alignments abgeleiteten Dendrogramme wurde TREEVIEW 1.6 (PAGE 1996; <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) verwendet.

2.8.2 Molecular Modelling

Dreidimensionale Modelle von niedermolekularen Verbindungen wurden mit dem Programm CHEM3D PRO (CHEMOFFICE ULTRA 4.0, CambridgeSoft Corp., Cambridge, MA, USA; <http://www.camsoft.com>) berechnet. Für die Energieminimierung dieser Modelle wurde das Programm MM2 (ALLINGER, 1977) verwendet. Alternativ dazu wurden 3D-Molekülmodelle auch mit dem Programm CORINA (CORdiNates; SADOWSKI *et al.*, 1994; http://www2.ccc.uni-erlangen.de/software/corina/free_struct.html) erzeugt.

2.8.3 Analyse von Protein-3D-Strukturen

Zur Analyse und Darstellung der 3D-Struktur von Proteinen wurden die Programme SWISS-PDBVIEWER 3.7 (GUEX & PEITSCH, 1996, 1997a, 1997b GUEX *et al.*, 1999; <http://www.expasy.org/spdbv>), RASMOL 2.6.4 (SAYLE & MILNER-WHITE, 1995; <http://www.umass.edu/microbio/rasmol>) und VIEWERLITE 4.2 (ACCELRY'S INC., San Diego, CA, USA; <http://www.accelrys.com>) verwendet. SWISS-PDBVIEWER wurde zudem auch eingesetzt, um die berechneten 3D-Molekülmodelle in das aktive Zentrum der SHC hinein zu modellieren und die SHC-Mutagenesen zu simulieren.

2.8.4 Gel-Densitometrie

Gefärbte SDS-Gele wurden als 8-Bit-Graustufenbilder im TIFF-Format mit einer Auflösung von 300 dpi eingescannt und mit dem Programm IMAGEJ 1.28 (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) analysiert. Dafür wurden einzelne Proteinbanden bzw. ganze Gelspuren markiert und das Helligkeitsprofil (Optische Dichte) des selektierten Gel-Bereiches durch densitometrische Analysen ermittelt. Aus den daraus abgeleiteten Linien-Plots wurden die Flächeninhalte der einzelnen Peaks in diesem Profil bestimmt und daraus die relativen Proteinkonzentrationen der einzelnen Banden abgeleitet. Da jeweils nur die Proteinbanden eines SDS-Geles miteinander verglichen wurden, konnte auf eine Kalibrierung mit externen Standards verzichtet werden.

2.8.5 Digitalisierung von Meßwerten

Die vom UV-Detektor bei den verschiedenen Chromatographiemethoden aufgezeichneten Kurven des Verlaufs der UV-Absorption wurden als TIFF-Dateien eingescannt. Mit den Programmen UTHSCSA IMAGETOOL 3.0 (<http://ddsdx.uthscsa.edu/dig/itdesc.html>) bzw. G3DATA 1.04 (<http://beam.helsinki.fi/~frantz/software/g3data.php>) wurde aus dem Verlauf der Kurven die X- und Y-Koordinaten einzelner Meßwerte bestimmt. Die weitere Bearbeitung der so digitalisierten Daten erfolgte dann mit MICROSOFT EXCEL.

3. Ergebnisse

3.1 Korrektur der SHC-Sequenz

3.1.1 Neusequenzierung

Im Verlauf dieser Arbeit wurden die Aminosäuresequenzen verschiedener bakterieller Squalen-Hopen-Cyclasen aufgeklärt. Beim Vergleich dieser Sequenzen fiel auf, daß die Cyclasen der beiden *Alicyclobacillus*-Arten *A. acidocaldarius* und *A. acidoterrestris* eine geringere Ähnlichkeit aufwiesen, als Cyclasen aus Vertretern unterschiedlicher Gattungen (z.B. *Bradyrhizobium japonicum* und *Rhodopseudomonas palustris*). Eine genauere Analyse zeigte, daß die SHC von *Alicyclobacillus acidocaldarius* in einem Sequenzbereich zwischen den Aminosäuren ~70 und ~240 die größten Abweichungen gegenüber den Sequenzen der anderen bakteriellen Cyclasen aufwies (**Abbildung 8**). Da diese Abweichungen möglicherweise auf eine fehlerhafte Sequenzierung durch OCHS (1990) zurückzuführen sind, wurde der betreffende Sequenzbereich mit Hilfe der beiden Primer AaSeq1 und AaSeq2 erneut sequenziert.

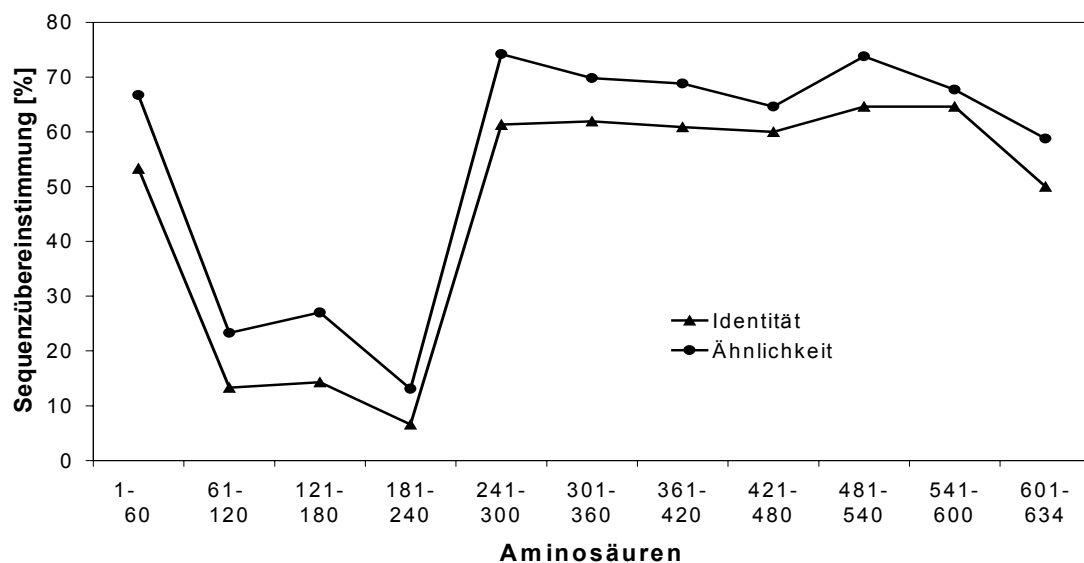


Abbildung 8: Ähnlichkeit und Identität der Aminosäuresequenz der SHC (Angaben in Prozent) von *Alicyclobacillus acidocaldarius* (OCHS, 1990) und *A. acidoterrestris* (CHOI, 1995). Dazu wurden die beiden Sequenzen vom N-Terminus ausgehend in jeweils 60 Aminosäuren umfassende Sequenzabschnitte unterteilt und deren Übereinstimmungen mit den Programmen ClustalX und BOXshade analysiert.

Bei der erneuten Sequenzierung konnten in diesem Sequenzabschnitt insgesamt sechs zusätzliche Nukleotide (Insertionen) sowie drei Nukleotidsubstitutionen nachgewiesen werden. Durch die Insertionen kommt es zu mehrfachen Leserasterverschiebungen, die im

Bereich zwischen den Aminosäuren D75 und A239 zu einer komplett neuen Aminosäuresequenz führen.

Erste Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse der SHC wiesen auf weitere Abweichungen von der publizierten Sequenz im C-terminalen Bereich hin (U. WENDT, persönliche Mitteilung). Durch Sequenzierungen mit dem M13 Universal-Primer konnten hier drei Nukleotidsubstitutionen nachgewiesen werden, die zu einer neuen Sequenz G600/F601 führen. Ebenso konnten durch C. FEIL (persönliche Mitteilung) einige weitere Sequenzveränderungen (Insertionen und Substitutionen) identifiziert werden (A271; R322/A323; R394/R395/R396, V448).

Alle nachgewiesenen Veränderungen der Nukleotidsequenz wurden verwendet, um eine korrigierte SHC-Sequenz zu erstellen (**Abbildung 9**), die in der GenBank hinterlegt wurde.

```

ATGGCTGAGCAGTTGGTGGAAAGCGCCGGCC TACGCGCGGACGCTGGATCGCGCGGTGGAG
M A E Q L V E A P A Y A R T L D R A V E20

TATCTCCTCTCCTGCCAAAAGGACGAAGGC TACTGGTGGGGGCCGCTTCTGAGCAACGTC
Y L L S C Q K D E G Y W W G P L L S N V40

ACGATGGAAGCGGAGTACGTCCTCTTGTGC CACATTCTCGATCGCGTCGATCGGGATCGC
T M E A E Y V L L C H I L D R V D R D R60

ATGGAGAAGATCCGGCGGTACCTGTTGCAC GAGCAGCGCGAGGACGGCACGTGGGCCCTG
M E K I R R Y L L H E Q R E D G T W A L80

TACCCGGGTGGGCCCGCCGACCTCGACACG ACCATCGAGGCGTACGTCGCGCTCAAGTAT
Y P G G P P D L D T T I E A Y V A L K Y100

ATCGGCATGTCGCGCGACGAGGAGCCGATG CAGAAGGCGCTCCGGTTCATTCAGAGCCAG
I G M S R D E E P M Q K A L R F I Q S Q120

GGCGGGATCGAGTCGTCGCGCGTGTTCACG CGGATGTGGCTGGCGCTGGTGGGAGAATAT
G G I E S S R V F T R M W L A L V G E Y140

CCGTGGGAGAAGGTGCCCATGGTCCC GCCG GAGATCATGTTCTCGGCAAGCGCATGCCG
P W E K V P M V P P E I M F L G K R M P160

```

CTCAACATCTACGAGTTTGGCTCGTGGGCT CGGGCGACCGTTCGTGGCGCTCTCGATTGTG
L N I Y E F G S W A R A T V V A L S I V₁₈₀

ATGAGCCGCCAGCCGGTGTTC~~CCCGCTGCC~~ GAGCGGGCGCGCGTCCCCGAGCTGTACGAG
M S R Q P V F P L P E R A R V P E L Y E₂₀₀

ACCGACGTGCCTCCGCGCCGGCGC~~GGTGCC~~ AAGGGAGGGGGTGGGTGGATCTTCGACGCG
T D V P P R R R G A K G G G G W I F D A₂₂₀

CTCGACCGGGCGCTGCACGGGT~~ATCAGAAG~~ CTGTCCGGTGCACCCGTTCCGCGCG~~CGGCC~~
L D R A L H G Y Q K L S V H P F R R A A₂₄₀

GAGATCCGCGCCTTGGACTGGTTGCTCGAG CGCCAGGCCGGAGACGGCAGCTGGGGCGGG
E I R A L D W L L E R Q A G D G S W G G₂₆₀

ATTCAGCCGCCTTGGTTTTACGCGCTC~~ATC~~ ~~GGC~~CTCAAGATTCTCGACATGACGCAGCAT
I Q P P W F Y A L I A L K I L D M T Q H₂₈₀

CCGGCGTTTCATCAAGGGCTGGGAAGGTCTA GAGCTGTACGGCGTGGAGCTGGATTACGGA
P A F I K G W E G L E L Y G V E L D Y G₃₀₀

GGATGGATGTTTCAGGCTTCCATCTCGCCG GTGTGGGACACGGGCCTCGCCGTGCTCGCG
G W M F Q A S I S P V W D T G L A V L A₃₂₀

CTGC~~GCG~~CTGCGGGGCTTCCGGCCGATCAC GACCGCTTGGTCAAGCGGGCGAGTGGCTG
L R A A G L P A D H D R L V K A G E W L₃₄₀

TTGGACCGGCAGATCACGGTTC~~CGGGCGAC~~ TGGGCGGTGAAGCGCCCGAACCTCAAGCCG
L D R Q I T V P G D W A V K R P N L K P₃₆₀

GGCGGGTTCGCGTTCCAGTTCGACAACGTG TACTACCCGGACGTGGACGACACGGCCGTC
G G F A F Q F D N V Y Y P D V D D T A V₃₈₀

GTGGTGTGGGCGCTCAACACCCTGCGCTTG CCGGACGAGC~~GCC~~CGCAG~~G~~CGGGACGCCATG
V V W A L N T L R L P D E R R R R D A M₄₀₀

ACGAAGGATTCCGCTGGATTGTCGGCATG CAGAGCTCGAACGGCGGTTGGGGCGCCTAC
T K G F R W I V G M Q S S N G G W G A Y₄₂₀

GACGTCGACAACACGAGCGATCTCCCGAAC CACATCCCGTTCTGCGACTTCGGCGAAGTG
 D V D N T S D L P N H I P F C D F G E V₄₄₀

X
 ACCGATCCGCCGTCAGAGGACCTCACCGCC CACGTGCTCGAGTGTTTCGGCAGCTTCGGG
 T D P P S E D **V** T A H V L E C F G S F G₄₆₀

TACGATGACGCCTGGAAGGTCATCCGGCGC GCGGTGGAATATCTCAAGCGGGAGCAGAAG
 Y D D A W K V I R R A V E Y L K R E Q K₄₈₀

CCGGACGGCAGCTGGTTCGGTCGTTGGGGC GTCAATTACCTCTACGGCACGGGCGCGGTG
 P D G S W F G R W G V N Y L Y G T G A V₅₀₀

GTGTCGGCGCTGAAGGCGGTCGGGATCGAC ACGCGCGAGCCGTACATTCAAAGGCGCTC
 V S A L K A V G I D T R E P Y I Q K A L₅₂₀

GACTGGGTCGAGCAGCATCAGAACCCGGAC GGC GGCTGGGGCGAGGACTGCCGCTCGTAC
 D W V E Q H Q N P D G G W G E D C R S Y₅₄₀

GAGGATCCGGCGTACGCGGGTAAGGGCGCG AGCACCCCGTCGCAGACGGCCTGGGCGCTG
 E D P A Y A G K G A S T P S Q T A W A L₅₆₀

ATGGCGCTCATCGCGGGCGGCAGGGCGGAG TCCGAGGCCGCGCGCCGCGGCGTGCAATAC
 M A L I A G G R A E S E A A R R G V Q Y₅₈₀

XX
 CTCGTGGAGACGCAGCGCCCGGACGGCGGC TGGGATGAGCCGTACTACACCGGCACGGGC
 L V E T Q R P D G G W D E P Y Y T G T **G**₆₀₀

X
TCCAGGGGATTTCTACCTCGGCTACACC ATGTACCGCCACGTGTTTCCGACGCTCGCG
F P G D F Y L G Y T M Y R H V F P T L A₆₂₀

CTCGGCCGCTACAAGCAAGCCATCGAGCGC AGGTGA
 L G R Y K Q A I E R R -

Abbildung 9: Korrigierte Nukleotidsequenz und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz der SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Horizontale Pfeile markieren die Sequenzbereiche, an die die beiden für die Sequenzkorrektur verwendeten Primer AaSeq1 und AaSeq2 binden. Veränderungen der Nukleotidsequenz im Vergleich zu der von OCHS *et al.* (1992) publizierte Sequenz sind grau unterlegt. Dabei sind Insertionen zusätzlich mit vertikalen Pfeilen (↓), Substitutionen durch ein X markiert. Bereiche mit einer veränderten Aminosäuresequenz sind fett gedruckt.

3.1.2 Analyse der korrigierten SHC-Sequenz

Insgesamt konnten bei der Sequenzüberprüfung 12 zusätzliche Nukleotide festgestellt werden. Damit umfaßt das SHC-Gen jetzt ein offenes Leseraster von 1896 bp. Die Anzahl der Aminosäuren erhöht sich damit um vier auf jetzt 631. Neben den Sequenzveränderungen durch zusätzliche Nukleotide konnten insgesamt neun Nukleotidsubstitutionen entdeckt werden, die in allen Fällen zu Veränderungen der Aminosäuresequenz führten. Dadurch erhöht sich das Molekulargewicht leicht von 69,4 kDa auf jetzt 71,5 kDa. Die Veränderungen in der Aminosäurezusammensetzung sind in **Tabelle 1** zusammengefaßt.

Tabelle 1: Aminosäurezusammensetzung der SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* nach der Sequenzkorrektur. In Klammern sind die Veränderungen zur publizierten Sequenz (OCHS *et al.*, 1992) angegeben. ⁽¹⁾: F + W + Y; ⁽²⁾: F + W + Y + I + L + M + V; ⁽³⁾: D + E; ⁽⁴⁾: K + R

Aminosäure	Anzahl	Anteil (%)	Aminosäure	Anzahl	Anteil (%)
A	57 (- 12)	9,0	M	16 (+ 7)	2,5
C	5 (- 8)	0,8	N	10 (+ 1)	1,6
D	44 (+/- 0)	7,0	P	41 (+ 4)	6,5
E	41 (+ 8)	6,5	Q	23 (+ 2)	3,6
F	22 (+ 7)	3,5	R	49 (- 17)	7,8
G	61 (- 6)	9,7	S	24 (- 13)	3,8
H	10 (- 2)	1,6	T	26 (- 3)	4,1
I	24 (+ 6)	3,8	V	43 (+ 4)	6,8
K	21 (+ 6)	3,3	W	25 (+ 4)	4,0
L	57 (+ 9)	9,0	Y	32 (+ 7)	5,1
aromatische ¹	79 (+ 18)	12,5	saure ³	85 (+ 8)	13,5
hydrophobe ²	219 (+ 44)	34,7	basische ⁴	70 (- 11)	11,1

Nach der Korrektur zeigt die SHC von *Alicyclobacillus acidocaldarius* wesentlich größere Übereinstimmungen mit der Sequenzen anderer bakterieller Cyclasen. Die Zahl der identischen Aminosäuren der Cyclasen der beiden *Alicyclobacillus*-Arten ist dadurch von 334 auf jetzt 402 angestiegen (entspricht 63,4 %), wobei von diesen alleine 84 auf den korrigierten Sequenzabschnitt entfallen. Entsprechend ist auch der Anteil der ähnlichen Aminosäuren von 62,4 auf 74,4 % angestiegen. Die Werte für Sequenzidentität bzw. Sequenzähnlichkeit für einige ausgewählte bakterielle Cyclasen sind in **Tabelle 2** zusammengestellt.

Tabelle 2: Übereinstimmungen der Aminosäuresequenzen der SHC einiger Bakterien. Angegeben sind die Prozentwerte für Identität (links unter der Diagonalen) und Ähnlichkeit (rechts oberhalb der Diagonalen). Die Werte wurden aus einem Sequenzalignment mit den Programmen ClustalX und Boxshade berechnet. *A. ac*: *Alicyclobacillus acidocaldarius*, *A. at*: *Alicyclobacillus acidoterrestris* (CHOI, 1995), *B. ja*: *Bradyrhizobium japonicum* (PERZL, 1996), *R. pa*: *Rhodopseudomonas palustris* (RAHN, 1996), *M. ca*: *Methylococcus capsulatus* (TIPPELT, 1997), *Z. mo*: *Zymomonas mobilis* (REIPEN et al., 1995)

	<i>A. ac</i>	<i>A. at</i>	<i>B. ja</i>	<i>R. pa</i>	<i>M. ca</i>	<i>Z. mo</i>
<i>A. ac</i>	---	74,4	48,3	49,8	48,3	47,3
<i>A. at</i>	63,4	---	45,9	47,2	45,9	44,5
<i>B. ja</i>	37,0	33,6	---	85,2	57,8	70,0
<i>R. pa</i>	38,0	35,0	77,7	---	57,6	68,9
<i>M. ca</i>	36,9	34,2	46,7	48,4	---	57,2
<i>Z. mo</i>	35,8	32,6	57,6	58,5	46,2	---

3.2 Deletionsmutanten der SHC

3.2.1 Konstruktion der Deletionsmutationen

Zu Beginn dieser Arbeit war die dreidimensionale Struktur der SHC noch nicht bekannt. Ziel war es deshalb, durch Mutagenese-Experimente die Aminosäuren zu identifizieren, die für die Enzymaktivität der SHC mitverantwortlich sind. Da von C. FEIL schon Experimente durchgeführt wurden, bei denen einzelne Aminosäuren in konservierten Sequenzmotiven (QW2-Motiv, DDTAV-Motiv) durch ortsspezifische Mutagenese verändert wurden (FEIL, 1996), sollten für die vorliegende Arbeit in einem ersten Schritt Deletionsmutanten erzeugt werden. Durch N- und C-terminale Deletionen sollte auf diese Weise die minimale aktive Enzymgröße festgestellt werden.

Für die Deletionsmutationen wurde der Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit (CLONTECH) und das Plasmid pCyc verwendet, welches von C. FEIL zur Verfügung gestellt wurde. Für dieses Plasmid wurde ein 2,2 kb großes DNA-Fragment mit dem kompletten SHC-Gen in die *Pst* I-Schnittstelle von pUC18 inseriert und zusätzlich nach dem Start-Codon der SHC 18 weitere Nukleotide mit der Sequenz (CATCAC)₃ eingefügt, die für sechs Histidin-Reste codieren. Mit Hilfe dieses N-terminalen His₆-tags wird die Aufreinigung der SHC über eine Metallaffinitätschromatographie (siehe 3.2.2) möglich. Außerdem wurde die singuläre *Ssp* I-Schnittstelle des Vektors durch einen Nukleotidaustausch in eine

ebenfalls nur einmal im pCyc vorkommende *EcoR* V-Schnittstelle umgewandelt (FEIL, 1996).

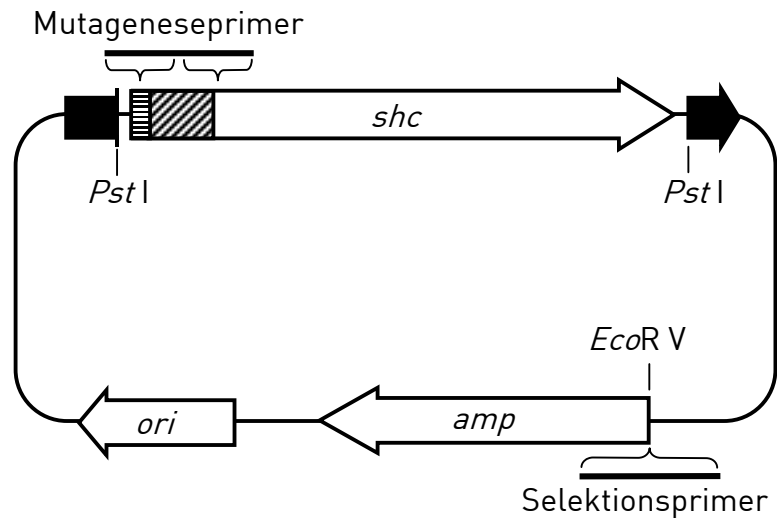


Abbildung 10: Schematische Darstellung des für die Deletionsmutationen verwendeten Plasmids pCyc. Ausgefüllter schwarzer Pfeil: *lacZ*-Gen mit in die *Pst* I-Schnittstelle hineinkloniertem SHC-Gen; *amp*: β -Lactamase, *ori*: Origin of Replication. Der N-terminale Bereich des SHC-Gens mit dem Start-Codon und den 6 His-Codons ist horizontal schraffiert; der durch den Mutageneseprimer deletierte Bereich des SHC-Gens ist schräg schraffiert dargestellt. Durch den Selektionsprimer wird die eingezeichnete singuläre *EcoR* V-Restriktionsschnittstelle zerstört.

Die Mutagenesen wurden entsprechend der Anleitung von CLONTECH mit zwei Primern durchgeführt: der Selektionsprimer zerstört die *EcoR* V-Schnittstelle und ermöglicht damit einer Selektion gegen unveränderte Wildtyp-DNA. Die gewünschte Mutation wird mit dem Mutageneseprimer erzeugt. Gleichzeitig wird durch eine stille Mutation durch diesen Primer eine in der Zielsequenz vorhandene Restriktionsschnittstelle zerstört oder aber eine neue Schnittstelle eingefügt (**Abbildung 10**). Näheres dazu ist bei der Besprechung der einzelnen Deletionsmutanten aufgeführt (siehe **3.2.4**). Dies führt bei einem Restriktionsverdau zu einem veränderten Restriktionsfragmentmuster und ermöglicht damit die Identifizierung der mutierten Klone. Bei diesen Klone wurde die Mutation anschließend noch durch Sequenzierung des von der Mutation betroffenen Sequenzbereichs verifiziert.

3.2.2 Proteinreinigung der Deletionsmutanten

Zur Proteingewinnung wurden Klone der Deletionsmutanten in 1000 ml LB-Amp-Medium herangezogen (siehe **2.3.2**). Die durch Zentrifugation abgetrennten Zellen wurden durch osmotischen Schock und Ultraschallbehandlung aufgeschlossen (siehe **2.6.5**). Durch Triton X-100 wurde die SHC solubilisiert und durch Zentrifugation von den Zellmembranresten befreit (siehe **2.6.6**). Durch einen nachfolgenden Hitzedenaturierungsschritte erfolgte eine weitere Aufkonzentrierung der SHC (siehe **2.6.7**). Dabei wurde die DelN1-Mutante ent-

sprechend der Reinigung des WT-Enzyms auf 60 °C erhitzt. Bei der Mutante DelN2 wurde wegen der wesentlich größeren Deletion (siehe 3.2.4) zur Sicherheit die Denaturierungstemperatur gleich auf 50 °C reduziert. Nach Abtrennung der denaturierten Proteine wurden der Lösung 2 mM Imidazol zugegeben und nach Entgasung zur weiteren Reinigung durch Metallaffinitätschromatographie auf die Ni²⁺-NTA-Agarose-Säulen aufgetragen. Zur Reinigung wurde die Säule mit jeweils mehreren ml Phosphatpuffer mit steigenden Imidazolkonzentrationen (10, 20, 30 und 50 mM) gespült, bevor mit Konzentrationen von 150 und 250 mM Imidazol die Cyclase eluiert wurde. Die Durchführung der Reinigung entsprechend der Standardvorschrift des Herstellers lieferte jedoch unbefriedigende Ergebnisse. So war die Bindung der SHC an die Ni²⁺-NTA-Agarose-Säulen so schwach, daß der größte Teil des Proteins schon bei den Waschschritten von der Säule eluiert wurde und deshalb die Eluatfraktionen nur noch minimale Reste der SHC enthielten. Um eine bessere Bindung der His₆-tag-SHC zu erreichen, wurden deshalb mit EDTA die Ni²⁺-Ionen aus dem Säulenmaterial herausgelöst und dieses zur Neubeladung mit Cu²⁺-Ionen mit CuSO₄-Lösung gespült (C. FEIL, persönliche Mitteilung). Ebenso wurden die Imidazolkonzentrationen der Waschpuffer auf 2, 4, 6 und 8 mM reduziert. Der Proteingehalt der einzelnen Elutionsfraktion wurde bestimmt (siehe 2.6.1). Die Gesamtausbeute in allen Eluatfraktionen betrug ca. 1,5 bis 2,0 mg Protein je Reinigung. Für die nachfolgenden Enzymtests wurden die Eluatfraktionen mit dem größten Proteingehalt verwendet (**Abbildung 11**).

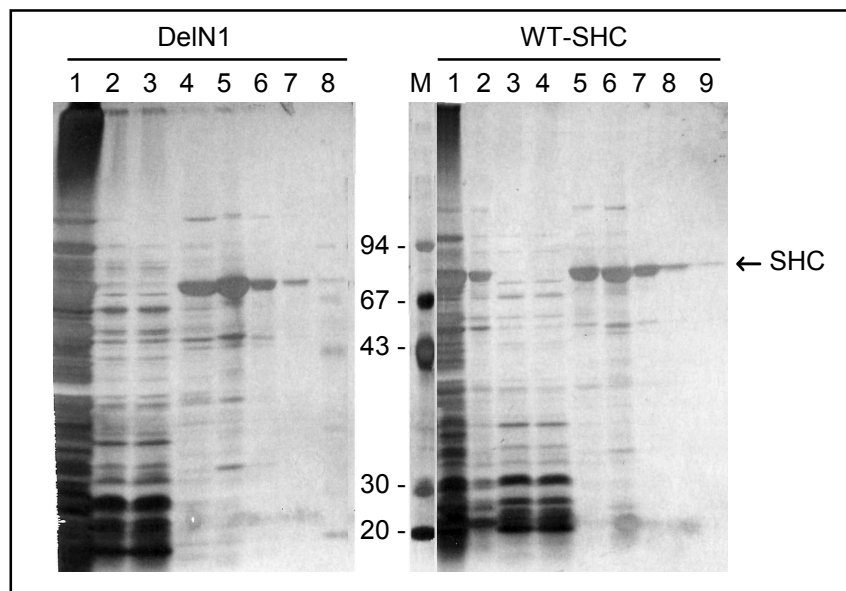


Abbildung 11: Aufreinigung von WT-SHC und DelN1-Mutante mit Cu²⁺-NTA-Agarose-Säulen über N-terminales His₆-tag. Proben der verschiedenen Reinigungsstufen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung sichtbar gemacht. **DelN1:** (1) Membransolubilisat; (2-3) Waschschrritte; (4-8) Eluatfraktionen; **M:** Molekulargewichtsmarker [Angaben in kDa]; **WT:** (1) Membransolubilisat (2) Überstand nach Hitzedenaturierung; (3-4) Waschschrritte; (5-9) Eluatfraktionen.

3.2.3 Enzymtest und Produktanalyse der Deletionsmutanten

Enzymtests wurden standardmäßig in einem Testvolumen von 1 ml durchgeführt (siehe **2.6.11**). Zu diesem Zeitpunkt war die später verwendete Methode zur Entfernung von Triton X-100 aus den Enzymtests noch nicht bekannt. Da Triton X-100 bei der gaschromatographischen Analyse der Enzymtests durch mehrere Peaks störend auffällt, wurden die Tests deshalb fast ausschließlich mit gereinigten, Triton-freien Proteinfractionen durchgeführt. Die Inkubation der Testansätze erfolgte beim WT-Enzym und der DelN1-Mutante bei 60 °C, während bei der DelN2-Mutante die Temperatur auf 48 - 50 °C reduziert wurde. Die Tests wurden bei diesen Temperaturen 0 bis 12 h inkubiert und die Reaktionsprodukte extrahiert und gaschromatographisch analysiert (siehe **2.7.1** und **2.7.3**). Mit den so ermittelten Peakflächen wurde der quantitative Umsatz von Squalen zu den Enzymprodukten (hauptsächlich Hopan und Diplopterol) mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Umsatz (\%)} = \frac{\sum (\text{Peakflächen aller Produkte mit } RT > RT_{\text{Squalen}}) \times 100}{\sum (\text{Peakflächen aller Produkte} + \text{Peakfläche von Squalen})}$$

3.2.4 Charakterisierung der SHC-Deletionsmutanten

3.2.4.1 DelN1

Bei dieser N-terminalen Deletionsmutante wurden die Aminosäuren A2 bis E7 deletiert. Bei der Zählung der AS wurden die sechs His-Reste des His-tags nach dem Start-Methionin nicht mitgezählt. Durch den Mutageneseprimer wurde eine in der DNA-Sequenz vorhandene *Nae* I-Schnittstelle durch eine stille Mutation zerstört, was die Identifizierung mehrerer positiver Klone anhand des veränderten Restriktionsfragmentmusters ermöglichte. Durch die eingefügte Deletion von 6 AS reduziert sich das Molekulargewicht der SHC um etwa 0,6 kDa, wobei diese Differenz im SDS-Gel nicht sichtbar war. Im Enzymtest zeigte die DelN1-Mutante bei kurzen Inkubationszeiten bis 30 min ca. 10 bis 25 % niedrigere Squalenumsatzraten als das WT-Enzym. Bei längeren Inkubationszeiten nähern sich die Umsatzraten schnell denen des WT-Enzyms an (**Abbildung 12**). Beim Produktspektrum konnten keine Unterschiede zwischen DelN1-Mutante und WT-Enzym festgestellt werden. In beiden Fällen wird neben Hopan als wichtigstes Nebenprodukt Diplopterol gebildet, wobei ca. 8 % der Hopanmenge erreicht werden. Daneben lassen sich gaschromatographisch zwischen den Peaks von Squalen und Hopan 9 weitere unbekannte Produkte nachweisen. Die Menge jedes einzelnen dieser Produkte beträgt nur 0,2 - 1,5 % des gebildeten Hopans, in der Summe werden 6 % der gebildeten Hopanmenge erreicht.

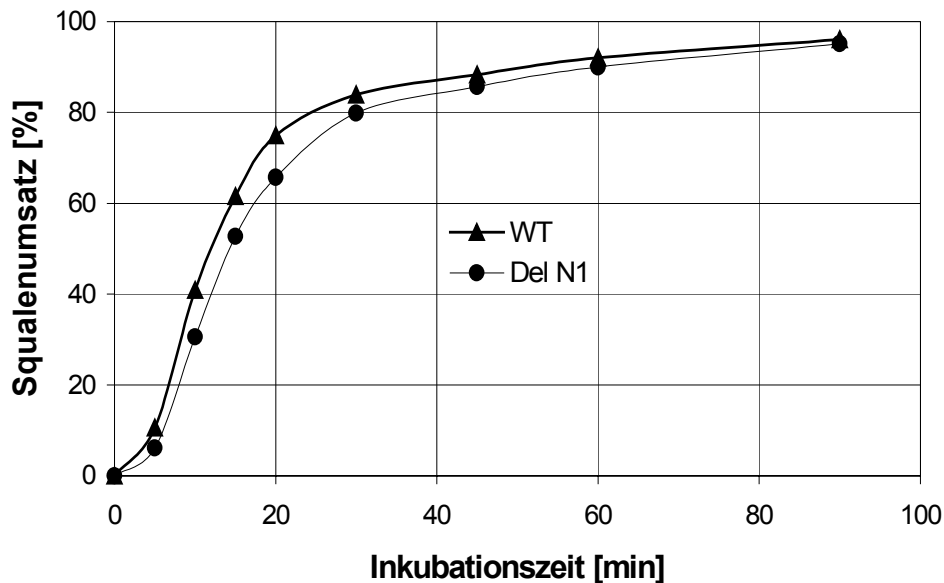


Abbildung 12: Squalenumsatzraten von WT-SHC und DelN1-Mutanten. Die Inkubation der Enzymtests erfolgte bei 60 °C. Für die Berechnung des Squalenumsatzes wurden alle Produkte mit größeren Retentionszeiten als Squalen berücksichtigt.

3.2.4.2 DeIN2

Bei der zweiten N-terminalen Deletionsmutante wurden 38 Aminosäuren (A2 bis N39) deletiert, was zu einer Reduzierung des Molekulargewichts um ~ 5 kDa führt. Positive Klone konnten mit Hilfe der mit dem Mutageneseprimer eingefügten neuen *Eco72* I-Schnittstelle identifiziert werden. Da diese Deletion das erste N-terminale konservierte QW-Motiv (QW6; siehe 1.3) umfaßte, mußte mit Auswirkungen auf die Proteinstruktur und damit auf die Hitzestabilität des Enzyms gerechnet werden. Deshalb wurde der Hitze-denaturierungsschritt bei der Proteinreinigung nur bei 50 °C durchgeführt. Bei der Analyse der Eluatfraktionen nach der Reinigung über Cu^{2+} -NTA-Agarose-Säulen konnten im SDS-PAGE nach Silberfärbung keine SHC-Banden nachgewiesen werden.

Im Rohextrakt konnte dagegen mit Hilfe eines Anti-SHC-Antikörpers eine entsprechende Proteinbande mit dem erwarteten MW von ca. 67 kDa nachgewiesen werden. Eine SHC-Aktivität ließ sich durch Enzymtests mit diesem Rohextrakt nach 12 h Inkubation bei 30, 50 und 60 °C jedoch nicht nachweisen.

3.2.4.3 C-terminale Deletionsmutanten

Neben den N-terminalen Deletionsmutanten wurde auch versucht, C-terminale Deletionen der SHC zu erzeugen. Für die DelC1-Mutante sollten die letzten 14 AS (T618 - R631) deletiert werden. Da sich die dabei eingeführte *Stu* I-Schnittstelle nicht nachweisen ließ, konnte die Bindung des Primers an die Ziel-DNA ausgeschlossen werden. Deshalb wurde

mit Hilfe der PCR ein entsprechendes verkürztes SHC-Amplifikat erzeugt (**Abbildung 13**). Die im SHC-Gen vorkommende *BamH* I-Schnittstelle konnte durch einen Nukleotid-austausch zerstört werden. Das ca. 2 kb großes PCR-Amplifikat wurde in den pQE-8-Vektor kloniert. Eine Restriktionsverdauanalyse lieferte jedoch ein anderes Ergebnis, als es aufgrund der klonierten Sequenz zu erwarten gewesen wäre, weshalb der so erzielte Klon verworfen wurde.

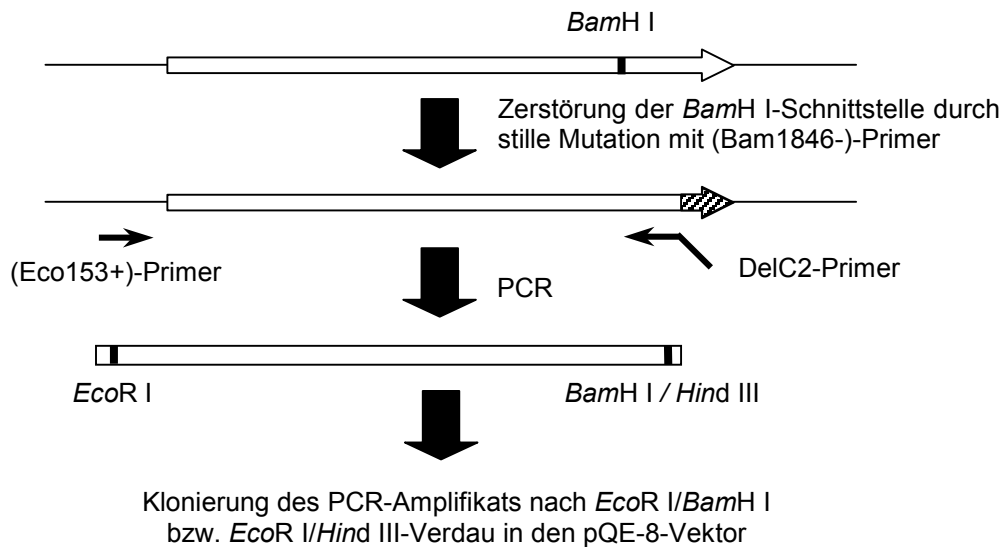


Abbildung 13: Strategie für die Konstruktion der DelC2-Mutante. Weiße Pfeile: SHC-Gen; schraffierte Pfeilspitze: deletierter C-terminaler Genabschnitt. Die Umklonierung des PCR-Amplifikats erfolgt mit den über die Primer eingeführten Restriktionsschnittstellen (*EcoR* I durch Eco153+ sowie *BamH* I und *Hind* III durch den DelC2-Primer. Im pQE-8 sorgen dann in allen 3 Leserastern vorhandene Stop-Codons für eine Termination der SHC-Translation.

Parallel dazu wurde versucht, mit dem Primer DelC3 durch Insertion von 3 Stop-Codons TAATAGTGA in das SHC-Gen zwischen die Codons für D592 und E593 eine Termination der Translation und damit eine Deletion der 39 letzten AS (E593 - R631) zu erreichen. Wie bei der Konstruktion der DelC1-Mutante konnte auch hier eine Bindung des Mutagenesprimers an die Ziel-DNA nicht erreicht werden.

Die bei den Deletionsmutagenesen aufgetretenen Problemen und die Fortschritte bei der Röntgenstrukturanalyse der SHC von *A. acidocaldarius* führten zu einer kompletten Änderung der weiteren Arbeitsstrategie (siehe 3.3.1). Aus diesem Grund wurden an dieser Stelle die Versuche zur Konstruktion von Deletionsmutanten eingestellt.

3.3 Alanin-Scanning-Mutagenese der SHC

3.3.1 Konstruktion der SHC-Mutanten

Für die ortsspezifische Mutagenese von einzelnen Aminosäuren des aktiven Zentrums, die dabei durch Alanin ersetzt wurden, wurden hauptsächlich die bei bakteriellen Cyclasen konservierten aromatischen Aminosäuren ausgewählt. Nichtaromatische AS wurden berücksichtigt, wenn aufgrund ihrer Lage im aktiven Zentrum ein Einfluß auf die Enzymaktivität vermutet werden konnte (U. WENDT, persönl. Mitteilung). Die näheren Angaben zu den hergestellten Mutanten sind in 3.3.4 zusammengestellt. Für die Konstruktion dieser Alanin-scanning-Mutagenesen wurde ebenfalls der Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit von CLONTECH verwendet (siehe 2.4.7). Um eine bessere Proteinexpression als mit dem bisher verwendeten Plasmid pCyc zu erreichen, wurde für diese Experimente ausschließlich das Plasmid pKSHC (siehe 2.2.3) verwendet, welches von U. WENDT zur Verfügung gestellt wurde (WENDT, 1994, 1997). Als Wirtstamm für die Proteinexpression des zugrundeliegenden Plasmids pKK223-3 wird vom Hersteller der Stamm *E. coli* JM 105 empfohlen. Eine Expression in *E. coli* JM 83 lieferte vergleichbare Proteinmengen. Wegen den geringeren Ansprüchen dieses Stammes an das Kulturmedium und einer damit verbundenen leichteren Handhabung wurde deshalb ausschließlich dieser Stamm für die Expression der mutierten Cyclasen verwendet.

Für die Mutagenese-prozedur wurde der Selektionsprimer pKKmut konstruiert, mit dem die singuläre *Nde* I-Schnittstelle zerstört wird. Da *Nde* I empfindlich auf Verunreinigungen in Miniprep-DNA reagiert, mußten für eine erfolgreiche Selektion bei der gesamten Mutagenese-prozedur DNA mit einem besseren Reinigungsgrad verwendet werden. Aus diesem Grund wurden die Plasmidisolierung immer mit dem NucleoSpin Kit durchgeführt (siehe 2.4.1).

Bei den ersten auf diese Weise erzeugten Mutanten H451A, W489A und F601A konnte jedoch keine Expression des Cyclase-Gens mehr nachgewiesen werden. Als Ursache dafür wurde eine Inaktivierung des SHC-Gens während der Mutagenese-prozedur durch eine zusätzliche spontane Mutation im SHC-Gen oder in dessen Promotor vermutet. Um die Wahrscheinlichkeit einer solchen Inaktivierung zukünftig zu minimieren, wurde bei allen weiteren Mutageneseexperimenten statt dem kompletten SHC-Gen nur noch kleinere Genfragmente verwendet. Dafür wurden geeignete Restriktionsschnittstellen ausgesucht, um fünf Fragmente des SHC-Gens von vergleichbarer Größe zu bekommen (**Abbildung 14**). Aufgrund der C-terminalen Lage der für die Alanin-scanning Mutagenesen ausge-

suchten Aminosäuren wurden von diesen nur die Fragmente CycC, CycD, CycE und CycDE isoliert und in pUC18 kloniert. Bei allen klonierten SHC-Fragmenten wurde durch Doppelstrangsequenzierung ausschließlich die WT-SHC-Sequenz nachgewiesen.

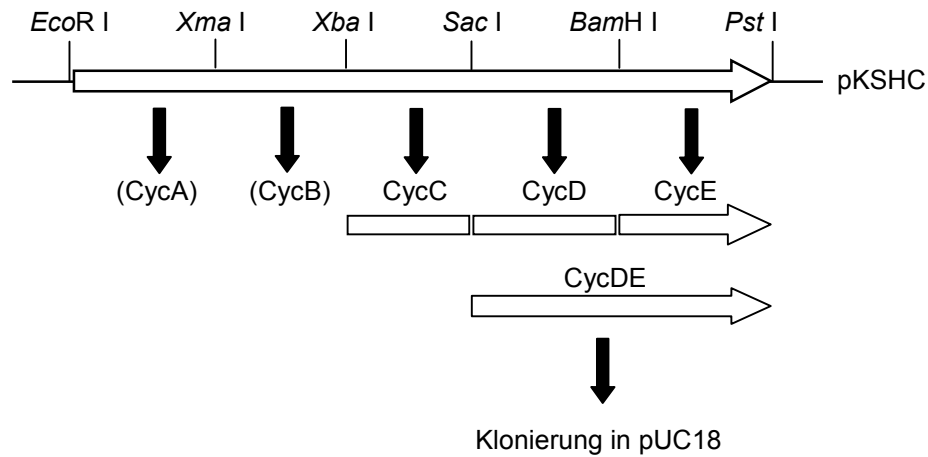


Abbildung 14: Subklonierung der SHC-Fragmente aus pKSHC. Nur die Fragmente CycC, CycD, CycE und CycDE wurden isoliert und für die Herstellung der Plasmide pUC-CycC, pUC-CycD, pUC-CycE und pUC-CycDE in den Vektor pUC18 kloniert.

Weitere Angaben zu den isolierten Fragmenten sind in **Tabelle 3** zusammengestellt.

Tabelle 3: Eigenschaften der isolierten SHC-Fragmente

Fragment	Größe [bp]	Schnittstellen	AS-Sequenz
CycC	362	<i>Xba</i> I / <i>Sac</i> I	L290 - S412
CycD	382	<i>Sac</i> I / <i>Bam</i> H I	S412 - D542
CycE	388	<i>Bam</i> H I / <i>Pst</i> I	D542 - R631
CycDE	774	<i>Sac</i> I / <i>Pst</i> I	S412 - R631

Für Mutagenesen in pUC-CycD, pUC-CycE und pUC-CycDE wurde der neue Selektionsprimer pUC-SspIA bzw. pUC-SspIB für Mutationen in pUC-CycC (Bindung am komplementären DNA-Strang wegen der im Vergleich zu den anderen Cyc-Fragmenten entgegengesetzten Insertionsrichtung in die multiple cloning site von pUC18) konstruiert. Mit beiden Selektionsprimern wird die singuläre *Ssp* I-Schnittstelle in der pUC18-Sequenz zerstört.

Um bei den bisher erzielten Mutanten H451A, W489A und F601A doch noch eine Proteinexpression zu erreichen, wurden aus den mutierten pKSHC-Plasmiden ebenfalls das CycDE-Fragment isoliert, in pUC18 umkloniert und nochmals sequenziert. Außer dem beab-

sichtigten Aminosäureaustausch wurden in keinem Fall weitere Sequenzänderungen gefunden.

Für die Proteinexpression wurden aus den mutierten pUC-CycDE-Plasmiden das Insert herausgeschnitten und in pKSHC zurückkloniert, wobei jeweils das entsprechende WT-Genfragment ersetzt wurde. Dazu wurden die Ansätze nach dem Restriktionsverdau im Agarosegel aufgetrennt und die gewünschten DNA-Fragmente für die Ligation aus dem Agarosegel isoliert. Trotz Verwendung unterschiedlicher Methoden (siehe 2.4.9), konnten nach Transformation der Ligationsansätze keine Klone isoliert werden. Deshalb wurde auf eine Isolierung der DNA-Fragmente verzichtet und die Ansätze direkt nach dem Restriktionsverdau für die Ligation verwendet. Um dabei eine Religation von pCycDE zu verhindern, wurde diese DNA zusätzlich mit *Dra* I und *Bsp*H I verdaut. Da die pUC18-Sequenz jeweils drei Schnittstellen für jedes dieser beiden Enzyme besitzt, konnte eine erfolgreiche Religation der auf diese Weise erzeugten zahlreichen Plasmidfragmente ausgeschlossen werden.

Bedingt durch die nachträgliche Änderung der Mutagenesestrategie wurden in einigen Fällen bei der Mutagenese Schnittstellen der Enzyme eingeführt, mit denen auch das CycDE-Fragment konstruiert wurde. Damit konnten bei diesen Mutanten das CycDE-Fragment nicht mehr für die Rückklonierung verwendet werden. In diesen Fällen wurden mit Hilfe anderer Restriktionsenzyme geeignete SHC-Fragmente für die Rückklonierung aus pUC-CycDE herausgeschnitten (**Abbildung 15**).

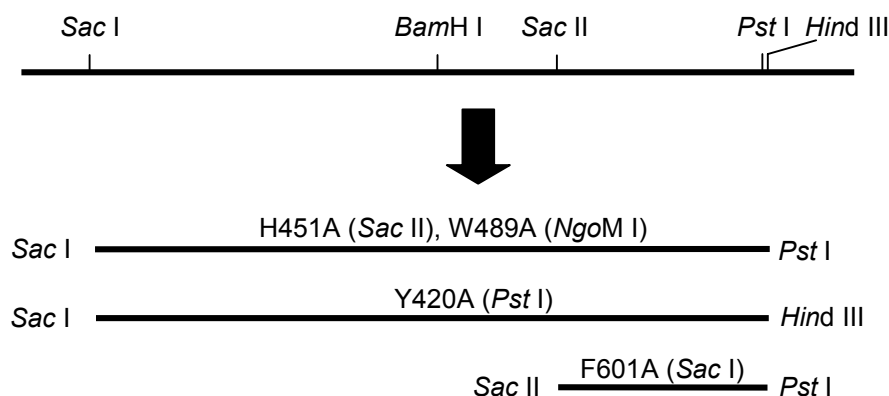


Abbildung 15: Isolierung von mutierten SHC-Fragmenten aus pUC-CycDE für die Rückklonierung in pKSHC. Neben den dafür verwendeten Restriktionsenzymen sind bei den einzelnen Fragmenten in Klammern zusätzlich die beim AS-Austausch gegen Ala eingeführten Restriktionschnittstellen angegeben.

Bei den anschließend isolierten Klonen wurde der erfolgreiche Austausch der WT-Sequenz gegen die mutierte Sequenz anhand des veränderten Restriktionsfragmentmusters kontrolliert und diese Klone für die Proteinexpression verwendet.

3.3.2 Proteinreinigung

Zur Aktivitätsbestimmung der Mutanten wurden die entsprechenden Klone in 2 l LB-Amp-Medium kultiviert und die abgeernteten Zellen (ca. 10 g Feuchtgewicht) für die Proteinreinigung aufgeschlossen. Der Zellaufschluß erfolgte dabei durch osmotischen Schock und Ultraschallbehandlung (siehe 2.6.5). Mutanten mit verändertem Produktspektrum wurden zusätzlich in einem 20 l-Fermenter kultiviert, um für die Produktisolierung und Produktidentifizierung ausreichend Material zu erhalten (Ausbeute 80 - 90 g Feuchtgewicht).

Da die Verwendung des Plasmids pKSHC bei der Expression eine Cyclase ohne N-terminales His-tag liefert, konnte die bisher für die Proteinreinigung verwendete Metallaffinitätschromatographie (siehe 2.6.9) nicht mehr benutzt werden. Es wurde deshalb die von U. WENDT verwendete Reinigung durch Anionenaustauschchromatographie übernommen (WENDT 1994, 1997). Dafür wurde nach Membranisolierung und Anreicherung durch Hitze-denaturierung (siehe 2.6.7) die Proteinlösung entgast und auf eine Säule mit Q Sepharose HP aufgetragen. Bei Verwendung eines NaCl-Gradienten von 0,1 bis 0,4 M erfolgte die Elution der SHC als nahezu einziges Protein ab einer NaCl-Konzentration von ca. 0,25 M. Der Verlauf der UV-Absorption bei $\lambda = 280$ nm im Säulendurchlauf während der Anionenaustauschchromatographie ist in **Abbildung 16** dargestellt.

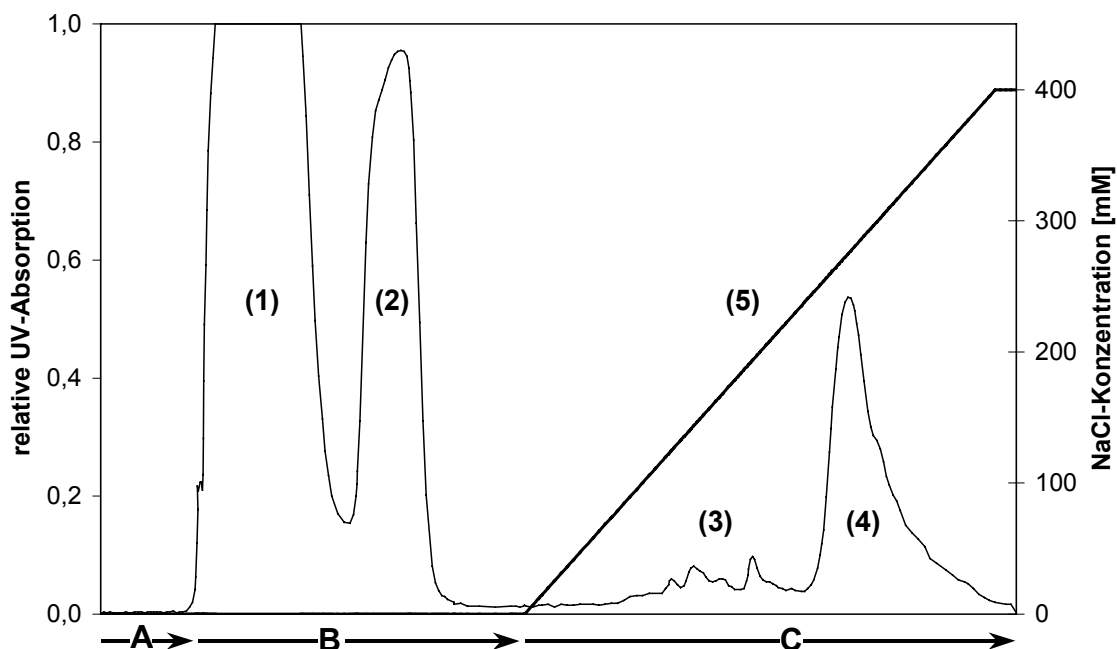


Abbildung 16: Verlauf der relativen UV-Absorption bei $\lambda=280$ nm im Säulendurchlauf bei der Reinigung der WT-SHC durch Anionenaustauschchromatographie. Probenauflauf (A); Waschschrift mit Triton X-100-freiem Puffer (B); Elution mit steigendem NaCl-Gradient (C); Triton X-100 (1); nichtproteinhaltige Verunreinigungen (2); proteinhaltige Verunreinigungen (3); SHC (4); Konzentration des NaCl-Gradienten im Elutionspuffer (5).

Die maximale Proteinkonzentration betrug in den Eluatfraktionen $\sim 0,65 \text{ mg} \times \text{ml}^{-1}$. Insgesamt konnten aus einer 2 l-Kultur ca. 70 mg SHC isoliert werden. Die Reinheit der SHC-haltigen Eluatfraktionen wurde durch SDS-PAGE kontrolliert, die Fraktionen wurden vereinigt und nach Zugabe von 30 % Glycerin [v/v] bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

Da bei den Mutanten mit einer reduzierten Hitzestabilität gerechnet werden mußte, wurde diese in Vorversuchen mit dem Rohextrakt ermittelt. Wurde bei reduzierter Hitzestabilität der Hitzedenaturierungsschritt nur bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ (statt $60 \text{ }^\circ\text{C}$) durchgeführt, führte dies zu einem wesentlich schlechteren Reinigungsergebnis bei der anschließenden Anionenaustauschchromatographie. Aus diesem Grund wurde bei einigen Mutanten auf eine Proteinreinigung verzichtet und die Enzymtests nur noch mit Rohextrakten durchgeführt (siehe 3.3.3).

3.3.3 Enzymtest

Bei gereinigten Proteinfractionen wurde der Enzymtest nach Standardvorschrift (siehe 2.6.11) in einem Gesamtvolumen von 1 ml durchgeführt und 1 bis 12 h bei $60 \text{ }^\circ\text{C}$ (bzw. bei einigen Mutanten reduziert auf $50 \text{ }^\circ\text{C}$) inkubiert.

Bei den Mutanten mit verändertem Produktspektrum wurde der Enzymtest für die Isolierung der Produkte mit Triton X-100-haltigem Rohextrakt durchgeführt. Das Testvolumen wurde auf ca. 600 ml erhöht und die Inkubationsdauer bei $50 \text{ }^\circ\text{C}$ auf 14 h ausgedehnt.

Die Lipidextraktion mit Hexan/Isopropanol (siehe 2.7.1) wurde bei den großvolumigen Testansätzen z.T. mehrfach wiederholt. Triton X-100 konnte aus den Lipidextrakten durch eine weitere chromatographische Reinigung über Kieselgel und Elution mit Hexan/Ethylacetat (S. MATSUDA, persönl. Mitteilung) entfernt werden (siehe 2.7.1). Dieser Reinigungsschritt wurde sooft wiederholt, bis bei der anschließenden GC-Analyse keine Spuren von Triton X-100 in der Probe mehr nachgewiesen werden konnten.

Neben den standardmäßig durchgeführten GC-Analysen (siehe 2.7.3) wurden Proben mit verändertem Produktspektrum durch GC/MS-Analysen (siehe 2.7.4) genauer untersucht. Eine dünnschichtchromatographische Auftrennung (siehe 2.7.2) der SHC-Produkte wurde nur in einigen Fällen durchgeführt. Neue Produkte der mutierten Cyclasen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. ROHMER, Universität Straßburg, weiter analysiert. Dazu wurden die einzelnen Verbindungen aus den zur Verfügung gestellten Lipidextrakten isoliert und deren Struktur u. a. durch NMR-Analysen (siehe 2.7.5) aufgeklärt.

Um qualitative Veränderungen des Produktspektrums bei den verschiedenen Mutanten trotz unterschiedlicher Enzymaktivität erkennen zu können, wurden von jedem gaschro-

matographisch detektierbaren Produkt mit Retentionszeiten zwischen denen von Squalen und Diplopterol der relative Anteil dieser Verbindungen an der Gesamtproduktmenge berechnet.

3.3.4 Charakterisierung der Alanin-scanning-Mutanten

3.3.4.1 Wildtyp-SHC

Die WT-Cyclase wurde zur Etablierung der Proteinreinigung durch Anionenaustauschchromatographie (siehe 3.3.2) verwendet. Daneben diente das Produktspektrum und der Squalenumsatz des Enzyms als Referenz für die Aktivitätstests der SHC-Mutanten. Im Verlauf dieser Arbeit wurden nach den beiden schon lange bekannten pentacyclischen Produkten Hopan und Diplopterol die Strukturen von sechs weiteren Nebenprodukten der SHC-Reaktion aufgeklärt (PALE-GROSDEMANGE *et al.*, 1998; siehe 1.3). Dabei handelt es sich um das ebenfalls pentacyclische Neohop-13(18)-en sowie die fünf tetracyclischen Triterpene Eupha-7,24-dien, 17-Isodammara-12,24-dien, 17-Isodammara-20(21),24-dien, Dammara-13(17),24-dien und Dammara-20(21),24-dien (Abbildung 17).

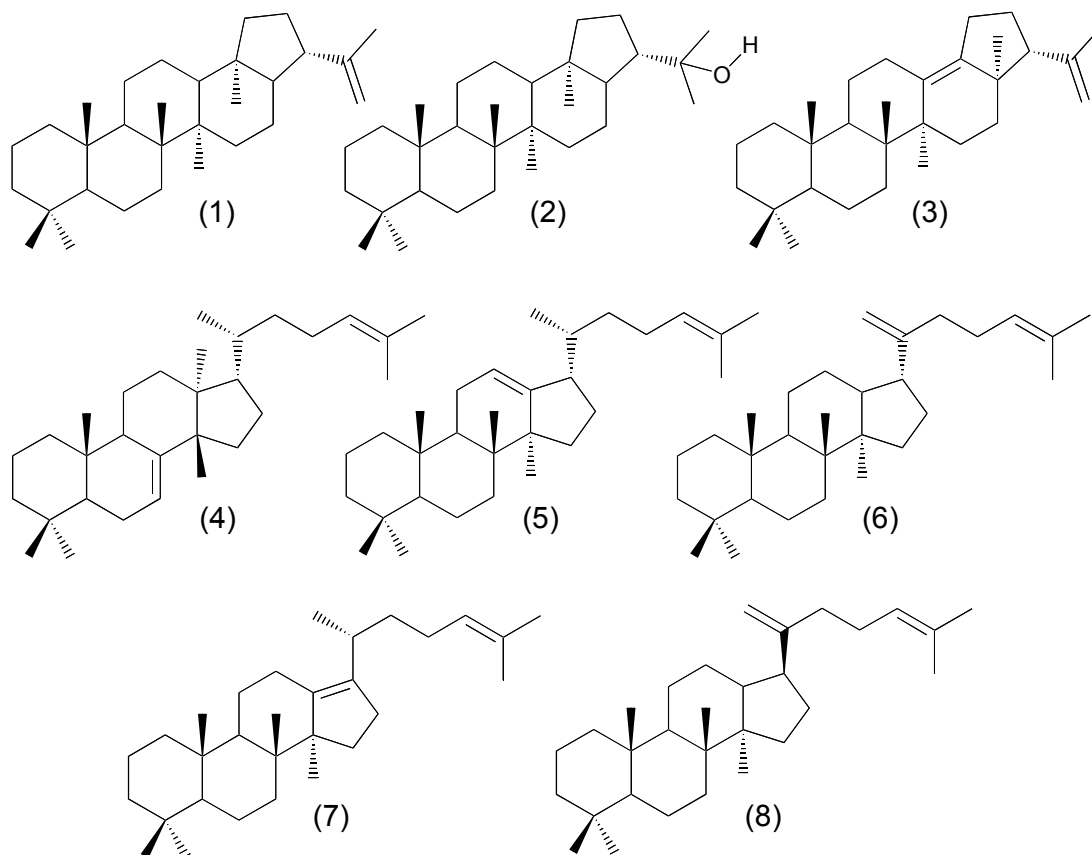


Abbildung 17: Strukturen der bisher isolierten und charakterisierten Reaktionsprodukte der WT-SHC. Hopan (1); Diplopterol (2); Neohop-13(18)-en (3); Eupha-7,24-dien (4); 17-Isodammara-12,24-dien (5); 17-Isodammara-20(21),24-dien (6); Dammara-13(17),24-dien (7); Dammara-20(21),24-dien (8).

Die Zuordnung dieser identifizierten Produkte der WT-SHC zu den einzelnen Peaks im GC-Chromatogramm erfolgte nach den Angaben von C. PALE-GROSDÉMANGE (persönl. Mitteilung) sowie durch Vergleich der Massenspektren dieser Verbindungen mit Literaturdaten (**Abbildung 18**).

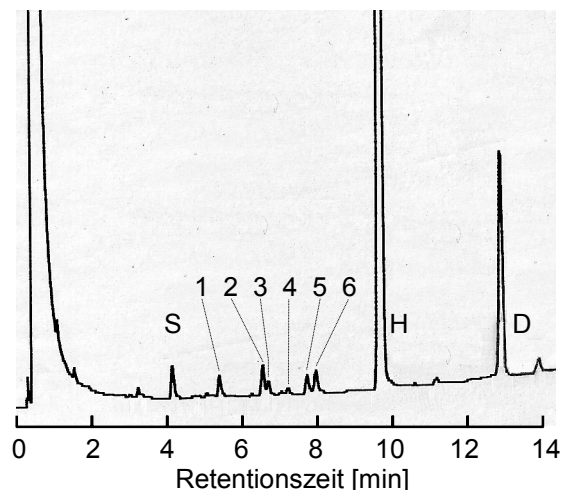


Abbildung 18: Gaschromatographische Analyse der Produkte eines Enzymtests mit der WT-SHC (14 h Inkubation bei 50 °C; Squalenumsatz 98,5 %). [S] Squalen (RT = 4,3 min), [H] Hoppen (RT = 9,7 min; Produktanteil = 80,9 %), [D] Diplopterol (12,8 min; 12,3%). [1] Dammara-13(17),24-dien (5,4 min; 0,87 %), [2] 17-Isodammara-12,24-dien (6,6 min; 1,55 %), [3] Eupha-7,24-dien (6,8 min; 0,7 %), [4] Neohop-13(18)-en (7,3 min; 0,38 %), [5] Dammara-20(21),24-dien (7,8 min; 0,91 %) [6] 17-Isodammara-20(21),24-dien (8,0 min; 1,29 %)

Die erstmals bei der Y420A-Mutante (siehe unten) isolierten und charakterisierten Produkte α -Polypodatetraen, γ -Polypodatetraen und 13 α (H)-Malabaricatrien konnten durch GC/MS-Analyse auch im Produktspektrum der WT-SHC nachgewiesen werden. Jedoch lagen diese drei Verbindungen bei den für die GC-Analysen gewählten Parametern aufgrund ihres geringen Produktanteils (α -Polypodatetraen: \sim 0,2 %; γ -Polypodatetraen: \sim 0,15 %; 13 α (H)-Malabaricatrien: \sim 0,1 %) unter der Nachweisgrenze und konnten deshalb im GC-Chromatogramm nicht detektiert werden.

3.3.4.2 H451A-SHC

Eine Proteinreinigung dieser Mutante, wie sie beim WT-Enzym etabliert wurde, lieferte keine Cyclase. Wie die Kontrolle der einzelnen Reinigungsschritte im SDS-Gel zeigte, war die SHC-Bande nach dem Hitzedenaturierungsschritt bei 60 °C nicht mehr vorhanden. Damit war erstmals bei einer SHC-Mutante durch die Mutagenese die Thermostabilität des Proteins reduziert worden. Da der Hitzedenaturierungsschritt entscheidend für die Effektivität der nachfolgenden Proteinreinigung durch Anionenaustauschchromatographie ist, wurde durch eine Versuchsreihe (siehe 2.6.8) eine reduzierte Denaturierungstemperatur

bestimmt, bei der anschließend der größere Teil der SHC noch gelöst im Überstand vorhanden ist (**Abbildung 19**).

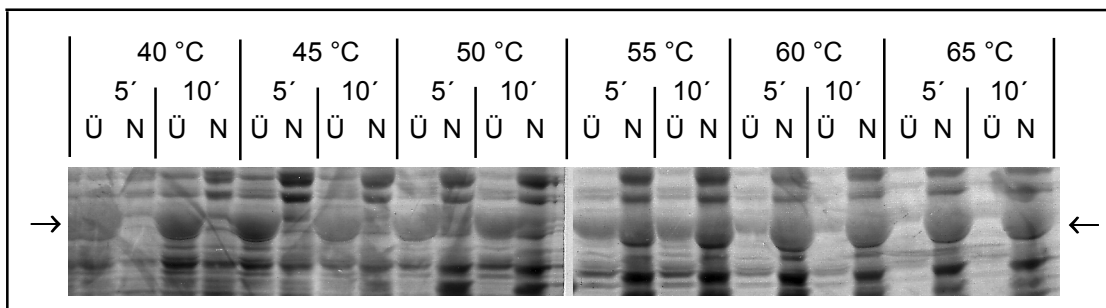


Abbildung 19: Hitzedenaturierung der H451A-SHC. Die Pfeile weisen auf die SHC-Bande im Gel. Nach Inkubation des Rohextraktes bei Temperaturen zwischen 40 und 65 °C für 5 bzw. 10 min wurden denaturierte Proteine abzentrifugiert. Zur Analyse wurden sowohl die Überstände [Ü] als auch die Niederschläge [N] im SDS-Gel aufgetrennt.

Mit Hilfe der Gel-Densitometrie wurden die Größen der SHC-Banden in den einzelnen Gelspuren analysiert und daraus der Anteil der Cyclase im Überstand bzw. im Niederschlag für jede der gemessenen Temperaturen bestimmt (**Abbildung 20**). Bei einer Inkubationsdauer von 5 min und einer Temperatur von ca. 57 °C ist die SHC in gleichen Anteilen im Überstand und im Niederschlag vorhanden. Bei einer 10-minütigen Inkubation wird diese Verteilung schon bei einer 2 °C niedrigeren Temperatur erreicht.

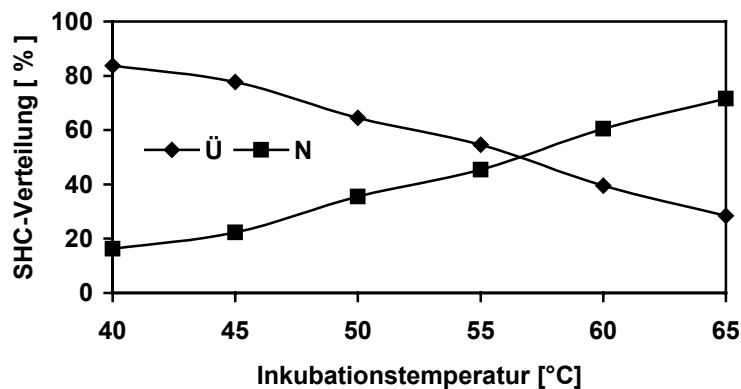


Abbildung 20: Hitzedenaturierung der H451A-SHC durch 5 min Inkubation bei den angegebenen Temperaturen und der daraus resultierenden Verteilung der SHC zwischen Überstand (Ü) und Niederschlag (N). Die einzelnen Meßwerte wurden durch geldensitometrische Analyse der Proteinbanden in **Abbildung 19** ermittelt.

Wie aus den **Abbildung 19** und **20** hervorgeht, ist bei einer Denaturierungstemperatur von 50 °C der größere Teil der SHC noch gelöst im Überstand vorhanden. Deshalb wurde für die Proteinreinigung ein Hitzedenaturierungsschritt bei dieser Temperatur durchgeführt. Sicherheitshalber wurde dabei die Inkubationsdauer von 10 auf 7 Minuten reduziert. Anschließend konnte diese Cyclase durch Anionenaustauschchromatographie isoliert werden.

Durch die Reduktion der Temperatur beim Hitzedenaturierungsschritt werden jedoch gleichzeitig auch weniger *E. coli*-Proteine denaturiert, was zu einer deutlichen Verschlechterung der Reinigungsqualität führt. So beträgt bei der Reinigung des WT-Enzyms (Denaturierungstemperatur 60 °C) der Anteil der SHC am Gesamtprotein in der Haupteluatfraktion nach densitometrischen Gelanalysen mehr als 90 %, während dieser Anteil bei der H451A-SHC auf unter 65 % absinkt.

Die Enzymtests wurden wegen der reduzierten Thermostabilität des Enzyms bei 50 °C durchgeführt. Im Vergleich zum WT-Enzym weist diese Mutante einen deutlich reduzierten Umsatz von Squalen auf, der nach 14 h Inkubation nur ca. 1/3 des Wertes der WT-SHC erreicht (**Tabelle 4**). Hauptprodukt der Enzymreaktion ist Hopen (RT = 9,7 min) mit einem Anteil von 85 %. Diplopterol (RT = 12,8 min) kann erst nach mehrstündiger Inkubation nachgewiesen werden und erreicht nach 14 h einen Anteil von ca. 10 %. Des weiteren können nach 14 h noch drei weitere Produkte gaschromatographisch nachgewiesen werden, die in geringer Menge vorhanden sind. Nach den übereinstimmenden Retentionszeiten mit den entsprechenden bekannten Nebenprodukten der WT-SHC dürfte es sich dabei um Dammara-13(17),24-dien (RT = 5,5 min; Produktanteil 1,8 %), 17-Isodammara-12,24-dien (6,6 min; 1,6 %) und 17-Isodammara-20(21),24-dien (8,0 min; 1,9 %) handeln.

3.3.4.3 W489A-SHC

Wie bei der H451A-Mutante wurde für die Proteinreinigung zuerst die Thermostabilität des Enzyms bestimmt (**Abbildung 21**).

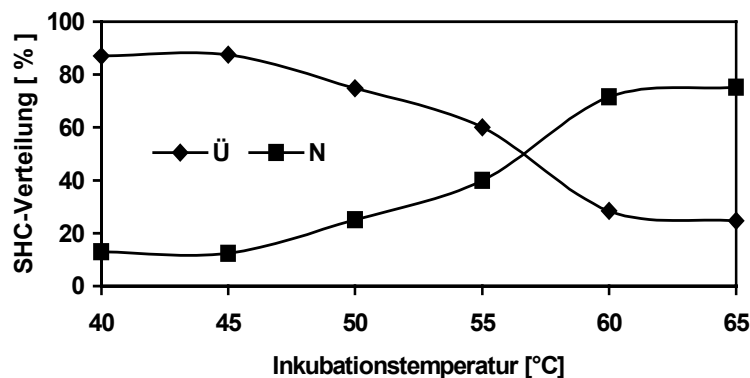


Abbildung 21: Hitzedenaturierung der W489A-SHC durch 5 min Inkubation bei den angegebenen Temperaturen und der daraus resultierenden Verteilung der SHC zwischen Überstand (Ü) und Niederschlag (N).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei der Proteinreinigung der W489A-SHC die Hitzedenaturierung bei 55 °C und einer Dauer von 7 min durchgeführt. Wieder führte dies im Vergleich zur WT-Reinigung zu einem deutlich reduzierten Reinheitsgrad des isolierten Proteins. Die Enzymtests wurden bei 50 °C durchgeführt. Dabei konnte auch bei mehrstündi-

ger Inkubation nur Hopan als Enzymprodukt nachgewiesen werden. Die Squalen-Umsatzraten dieser Mutante waren im Vergleich zu der H451A-Mutante nochmals deutlich reduziert (**Tabelle 4**).

Tabelle 4: Squalen-Umsatzraten von WT-, H451A- und W489A-SHC nach 1, 2,75 und 14 Stunden Inkubation bei 50 °C. Zur Formel für die Berechnung der Umsatzraten siehe 3.2.3. Dabei wurden im GC-Chromatogramm sämtliche Peakflächen mit Retentionszeiten größer der von Squalen und kleiner/gleich der von Diplopterol berücksichtigt.

Enzym	Squalenumsatz [%] nach		
	1 h	2,75 h	14 h
WT	93	97,5	99,4
H451A	4,9	10,3	37,3
W489A	1,3	4,3	6,9

3.3.4.4 F601A-SHC

Wie bei den beiden vorhergehenden Mutanten wurde auch bei dieser zuerst die Thermostabilität des Enzyms bestimmt. Wie aus **Abbildung 22** hervorgeht, weist die F601A-Mutante eine größere Temperaturstabilität als die beiden Mutanten H451A und W489A auf.

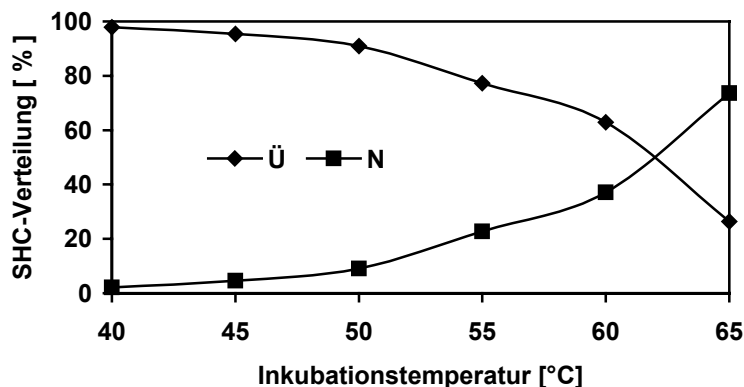


Abbildung 22: Hitzedenaturierung der F601A-SHC durch 5 min Inkubation bei den angegebenen Temperaturen und der daraus resultierenden Verteilung der SHC zwischen Überstand (Ü) und Niederschlag (N).

Ein Hitzedenaturierungsschritt wurde jedoch nicht mehr durchgeführt, da auf eine weitere Proteinreinigung ganz verzichtet wurde. Stattdessen wurde der Rohextrakt direkt für die Aktivitätsmessungen eingesetzt, die bei einer Temperatur von 50 °C durchgeführt wurden. Bei der gaschromatographischen Analyse der Enzymprodukte konnten erstmals bei einer

SHC-Mutante eine deutliche Veränderung im Produktspektrum festgestellt werden (**Abbildung 23**).

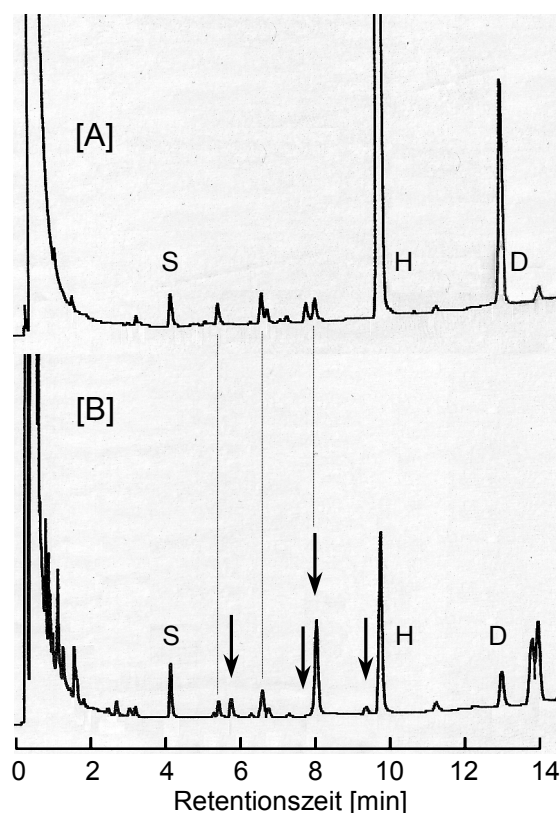


Abbildung 23: GC-Chromatogramme der Enzymprodukte der WT-SHC [A] und der F601A-SHC [B] nach 14 h Inkubation bei 50 °C. Squalen (S), Hopen (H), Diplopterol (D). Pfeile weisen auf Veränderungen des Produktspektrums bei der F601A-Mutante hin. Die in diesem GC-Chromatogramm vorhandenen zahlreichen Peaks mit RT < 3 min und > 13 min stammen von Lipidverunreinigungen des für die Enzymtests verwendeten Rohextraktes, während die Enzymtests mit der WT-SHC mit gereinigtem Enzym durchgeführt wurden. Die Peaks einiger identischer Produkte (mit steigenden RT: Dammara-13(17),24-dien, 17-Isodammara-12,24-dien und 17-Isodammara-20(21),24-dien) sind zur besseren Übersicht bei den beiden GC-Chromatogrammen durch Linien verbunden.

Das Hauptprodukt dieser Mutante ist Hopen, wobei dessen Anteil am Gesamtproduktspektrum nur noch 43,9 % beträgt. Das mengenmäßig zweithäufigste Produkt (RT = 8,0 min) hat einen Anteil von 22,8 %. Anhand der Retentionszeit und dem Massenspektrum und dessen Vergleich mit entsprechenden Literaturdaten von MASUDA *et al.* (1983) konnte diese Verbindung eindeutig als 17-Isodammara-20(21),24-dien identifiziert werden (**Abbildung 24**). Eine neu im GC-Chromatogramm auftretende Verbindung (RT = 9,3 min; Produktanteil = 2,2 %) konnte aus dem Produktgemisch nicht isoliert werden, weshalb die Struktur dieser Verbindung auch nicht durch NMR-Analysen geklärt werden konnte. Alle weiteren Veränderungen des Produktspektrums dieser Mutante im Vergleich zum WT-Produktspektrum sind in **Tabelle 5** zusammengefasst.

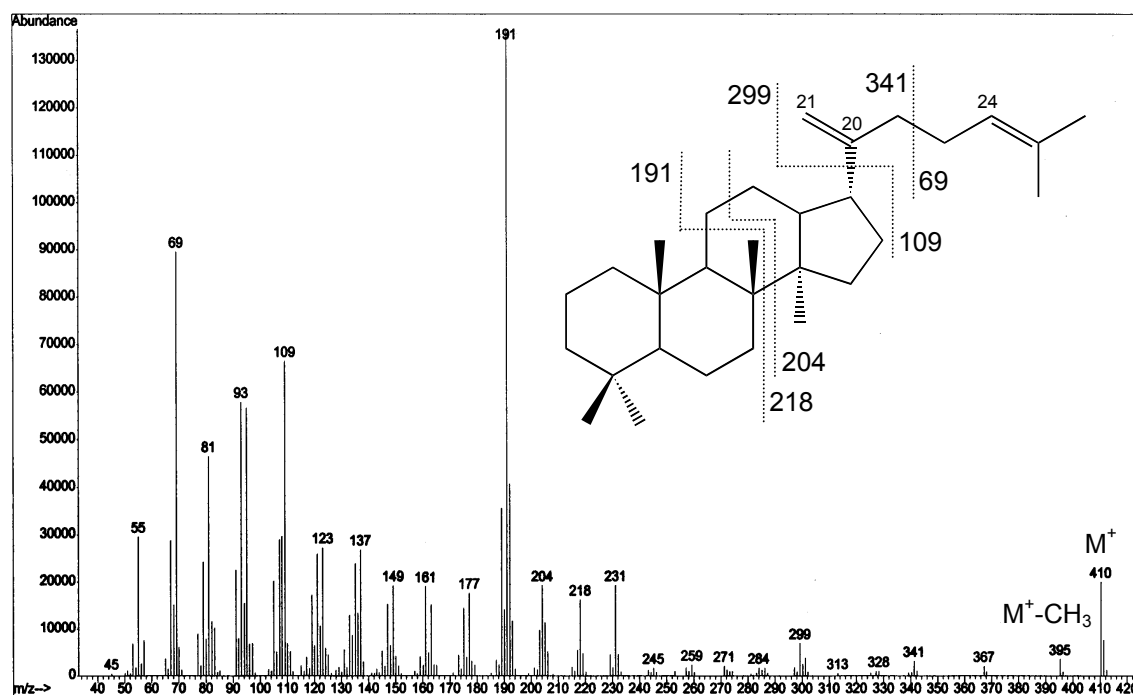


Abbildung 24: Massenspektrum und Fragmentierungsschema des von der F601A-SHC verstärkt gebildeten 17-Isodammara-20(21),24-dien. Durch sekundäre Abspaltung eines Protons oder von H_2 kann die Summe korrespondierender Massenfragmente kleiner als die des Molekular-Ions M^+ ($m/z = 410$) sein.

Tabelle 5: Häufigkeit der einzelnen Enzymprodukte im Produktspektrum von WT-SHC und F601A-SHC (siehe auch Abbildung 23). Das Produkt mit der RT = 5,8 min konnte anhand der Übereinstimmung bei der RT und dem Massenspektrum eindeutig als γ -Polypodatetraen identifiziert werden. Als Referenz diente das Produktspektrum der Y420A-SHC-Mutante (siehe unten).

Produkt	RT [min]	Produktanteil [%]	
		WT-SHC	F601A-SHC
Dammara-13(17),24-dien	5,4	0,9	3,1
Unbekannt	5,8	0,15	4,2
Unbekannt	6,3	0,14	0,7
17-Isodammara-12,24-dien	6,6	1,6	6,8
Eupha-7,24-dien	6,8	0,7	2,0
Neohop-13(18)-en	7,3	0,4	1,9
Dammara-20(21),24-dien	7,8	0,9	-
17-Isodammara-20(21),24-dien	8,0	1,3	22,8
Unbekannt	9,3	-	2,2
Hopen [H]	9,7	80,9	43,9
Diplopterol [D]	12,8	12,3	10,2

Wie bei den beiden vorausgegangenen SHC-Mutanten weist auch die F601A-SHC eine reduzierte Enzymaktivität auf. So wird nach zweistündiger Inkubation bei 50 °C nur knapp ein Drittel des Squalenumsatzes des WT-Enzyms erreicht. Innerhalb von 14 Stunden steigt dieser Wert jedoch noch auf über 90 % an (Tabelle 7).

3.3.4.5 Y420A-SHC

Enzymtests wurden bei dieser Mutante ausschließlich mit Rohextrakten durchgeführt, weshalb auf eine Proteinreinigung der SHC und auf Versuche zur Hitzedenaturierung verzichtet wurde. Nach den Erfahrungen bei den vorangegangenen Mutanten wurden alle Enzymtests bei 50 °C durchgeführt. Bei der GC-Analyse konnten erstmals im Enzymtest bei einer SHC mehrere neue Produkte detektiert werden (**Abbildung 25**).

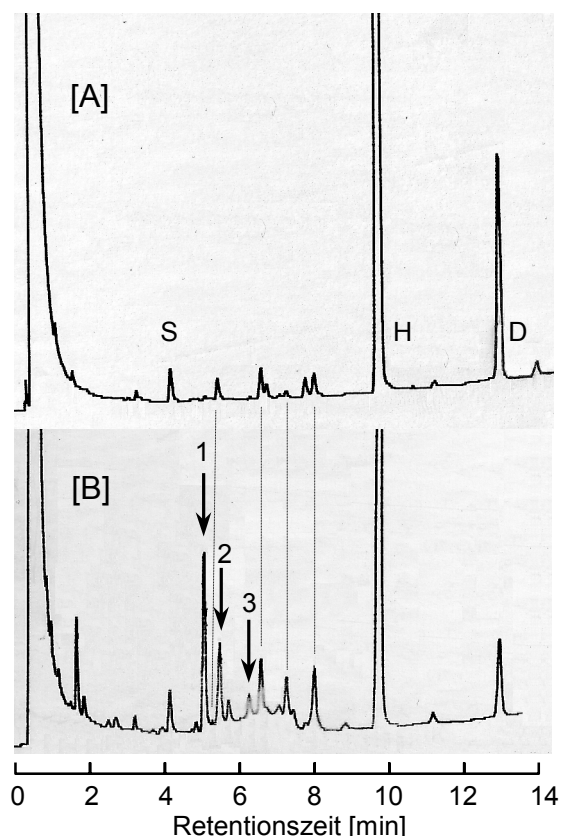


Abbildung 25: GC-Chromatogramme der Enzymprodukte der WT-SHC [A] und der Y420A-SHC [B] nach 14 h Inkubation bei 50 °C. Squalen (S), Hopan (H), Diplopterol (D). Pfeile weisen auf die charakterisierten neuen Nebenprodukte α -Polypodatetraen (1), γ -Polypodatetraen (2) und 13 α (H)-Malabaricatrien (3) hin. Die Peaks einiger identischer Produkte (mit steigenden RT: Dammara-13(17),24-dien, 17-Isodammara-12,24-dien, Neohop-13(18)-en und 17-Isodammara-20(21),24-dien) sind zur besseren Übersicht bei den beiden GC-Chromatogrammen durch Linien verbunden.

Für die Isolierung der neuen Produkte zur Strukturaufklärung wurde daraufhin diese Mutante zweimal im 20-Liter-Fermenter herangezogen. Nach Zellaufschluß von jeweils 20 g Zellen (siehe 2.6.5) wurde der Rohextrakt für großvolumigen Enzymtests verwendet (siehe 2.6.11) und die Lipide extrahiert und über Kieselgel von Triton X-100 befreit (siehe 2.7.1). Aus diesem gereinigtem Produktgemisch wurden drei der neuen SHC-Produkte in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. ROHMER, Universität Straßburg, durch präparative Dünnschichtchromatographie isoliert und deren Struktur durch ^1H - und ^{13}C -NMR, GC/MS und

GC aufgeklärt (PALE-GROSDEMANGE *et al.*, 1999). Die Massenspektren der neuen Verbindungen sind in **Abbildung 26 - 28** wiedergegeben.

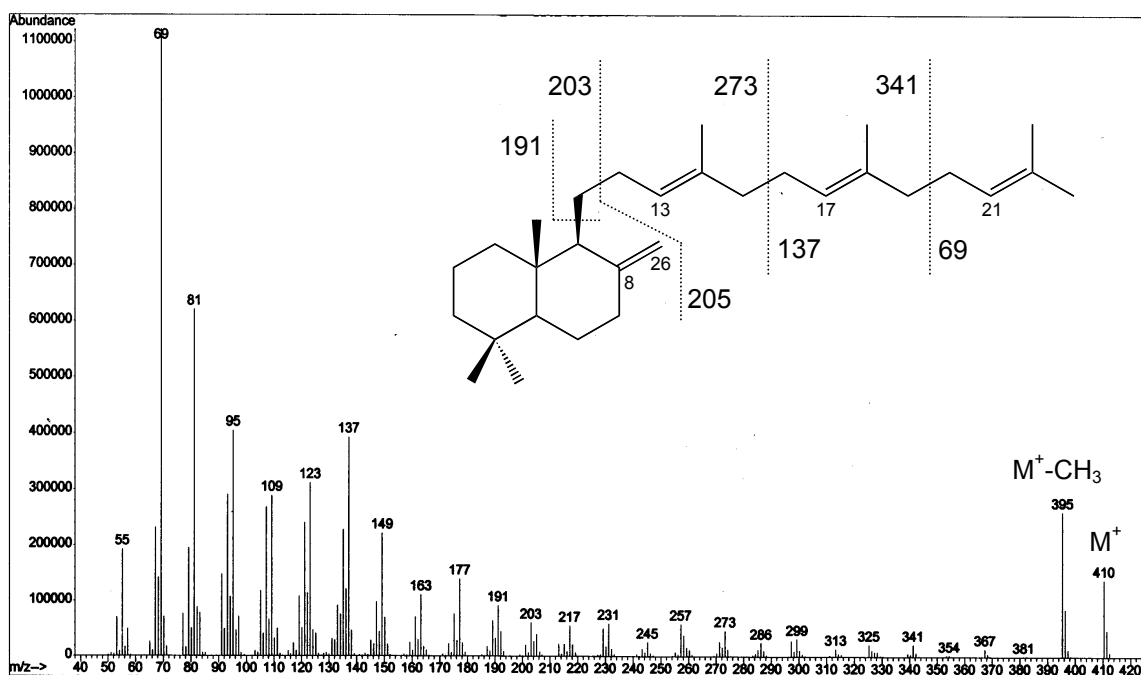


Abbildung 26: Massenspektrum und Fragmentierungsschema des von der Y420A-SHC verstärkt gebildeten α -Polypodatetraen (= Polypoda-8(26),13,17,21-tetraen). Zu den Massen der einzelnen Fragmente siehe auch Legende zu **Abbildung 24**.

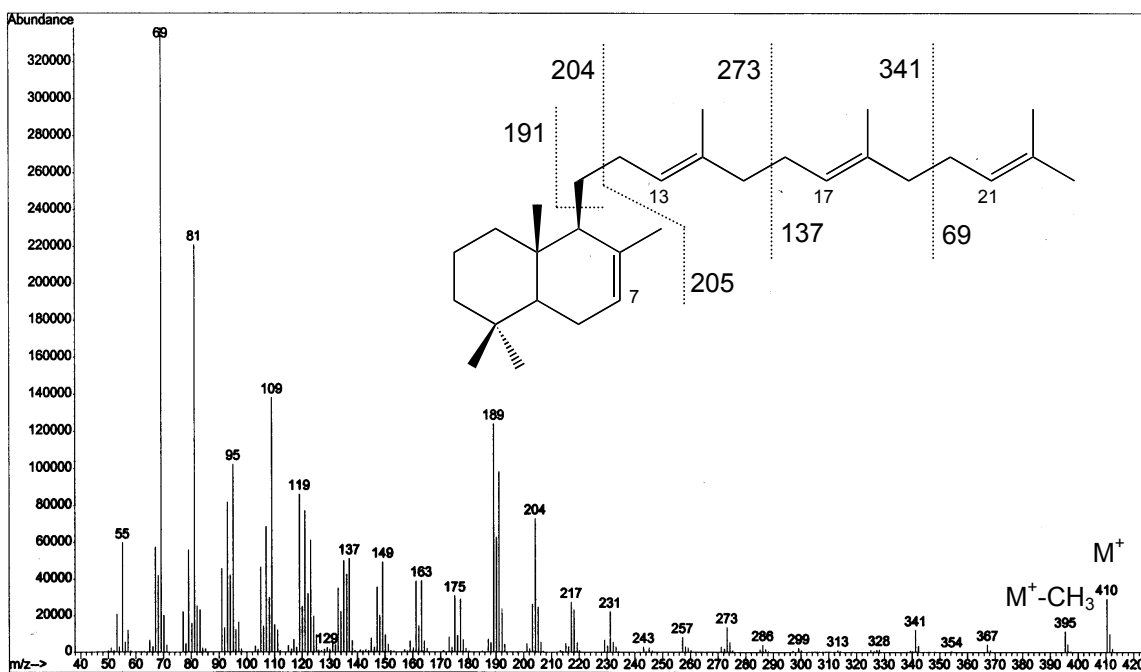


Abbildung 27: Massenspektrum und Fragmentierungsschema des von der Y420A-SHC verstärkt gebildeten γ -Polypodatetraen (= Polypoda-7,13,17,21-tetraen). Zu den Massen der einzelnen Fragmente siehe auch Legende zu **Abbildung 24**.

Die Massenspektren dieser beiden isomeren Polypodatetraenmoleküle lassen sich durch charakteristische Unterschiede bei den relativen Häufigkeiten einzelner Massenfragmente unterscheiden (SHIOJIMA *et al.*, 1983).

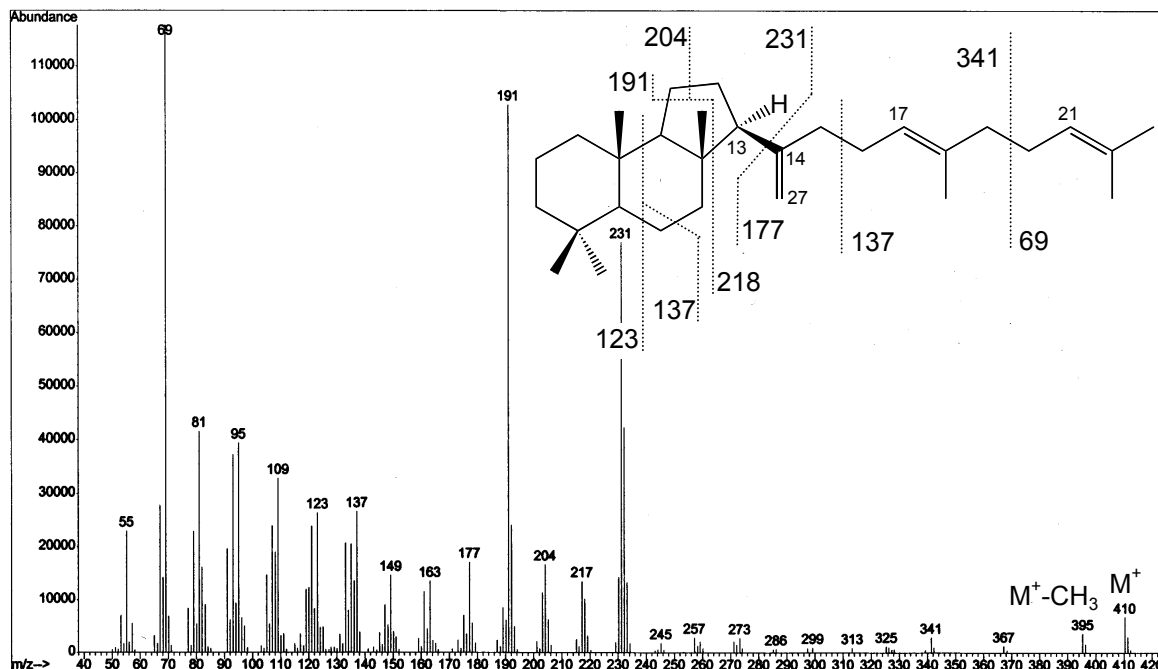


Abbildung 28: Massenspektrum und Fragmentierungsschema des von der Y420A-SHC verstärkt gebildeten $13\alpha(\text{H})$ -Malabaricatrien (= (17*E*)-13 $\alpha(\text{H})$ -Malabarica-14(27),17,21-trien). Zu den Massen der einzelnen Fragmente siehe auch Legende zu **Abbildung 24**. Als Vergleich wurden entsprechende MS-Literaturdaten von MASUDA *et al.* (1989) herangezogen.

Zusätzlich zu den drei neuen Nebenprodukten α - und γ -Polypodatetraen sowie Malabaricatrien konnten in der GC-Analyse vier weitere neue Nebenprodukte mit RT = 5,0 min (Produktanteil 0,4 %), 5,4 min (0,4 %), 7,1 min (3,0 %) und 7,5 min (1,6 %) nachgewiesen werden. Da diese Verbindungen jedoch nicht aus dem Produktgemisch isoliert wurden, konnte die Struktur dieser neuen SHC-Produkte auch nicht durch NMR-Analysen aufgeklärt werden. Alle im GC-Chromatogramm erkennbaren Produkte der Y420A-SHC sind mit deren prozentualen Anteil am Gesamtproduktgemisch in **Tabelle 6** aufgelistet.

Das Produktgemisch der Y420A-SHC mit den drei neuen charakterisierten Nebenprodukten wurde auch als Standard für die GC/MS-Analyse verwendet, mit dem die zum Teil nur minimalen Spuren von Polypodatetraen und Malabaricatrien im Produktgemisch des WT-Enzyms und der F601A-Mutante identifiziert werden konnten.

Auch bei der Y420A-SHC bewirkt der Austausch einer Aminosäure im aktiven Zentrum eine deutlichen Reduktion der Umsatzgeschwindigkeit. So wird nach einer einstündigen Inkubation gerade einmal ein Drittel des Squalenumsatzes des WT-Enzyms erreicht. Diese

Umsatzrate steigt allerdings bei längeren Inkubationszeiten noch deutlich an und hat nach 14 Stunden fast die des WT-Enzyms erreicht. Damit weist diese Cyclase von allen hier getesteten Alanin-scanning-Mutanten die größte Enzymaktivität auf (**Tabelle 7**).

Durch die hohen Squalen-Umsatzraten der Y420A- und der F601A-Mutante wurde die Isolierung der von diesen Enzymen gebildeten neuen Cyclisierungsprodukte in einer für die Strukturaufklärung ausreichenden Menge wesentlich erleichtert.

Tabelle 6: Häufigkeit der einzelnen Enzymprodukte im Produktspektrum von WT-SHC und Y420A-SHC (vergleiche Abbildung 25).

Produkt	RT [min]	Produktanteil [%]	
		WT-SHC	Y420A-SHC
Unbekannt	5,0	0	0,4
α -Polypodatetraen	5,2	0,2	8,7
Dammara-13(17),24-dien	5,4	0	0,4
γ -Polypodatetraen	5,5	0,9	5,4
Unbekannt	5,8	0,15	2,4
13 α (H)-Malabaricatrien	6,1	0,1	1,8
17-Isodammara-12,24-dien	6,6	1,6	3,0
Eupha-7,24-dien	6,8	0,7	7,6
Unbekannt	7,1	0	3,0
Neohop-13(18)-en	7,3	0,4	3,7
Unbekannt	7,5	0	3,7
Dammara-20(21),24-dien	7,8	0,9	0,6
17-Isodammara-20(21),24-dien	8,0	1,3	4,5
Hopen [H]	9,7	80,9	51,1
Diplopterol [D]	12,8	12,3	4,8

Tabelle 7: Squalen-Umsatzraten von WT-, Y420A- und F601A-SHC nach 2 und 14 Stunden Inkubation bei 50 °C. Zur Formel für die Berechnung der Umsatzraten siehe Tabelle 4.

Enzym	Squalenumsatz [%] nach	
	2 h	14 h
WT	98	99,4
Y420A	55,5	98,5
F601A	27,1	91,5

Eine Zusammenfassung der unterschiedlichen Squalen-Umsatzraten aller in dieser Arbeit beschriebenen Alanin-scanning-Mutanten der SHC im Vergleich zur Aktivität des WT zeigt **Abbildung 29**. Trotz Unterschieden beim Ansatz der Enzymtests (Verwendung von gereinigtem Protein bei der WT-, H451A- und W489A-SHC bzw. Rohextrakt bei der

Y420A- und F601A-SHC) können die bestimmten Enzymaktivitäten miteinander verglichen werden, da für alle Tests gleiche Zellmengen aufgearbeitet wurden.

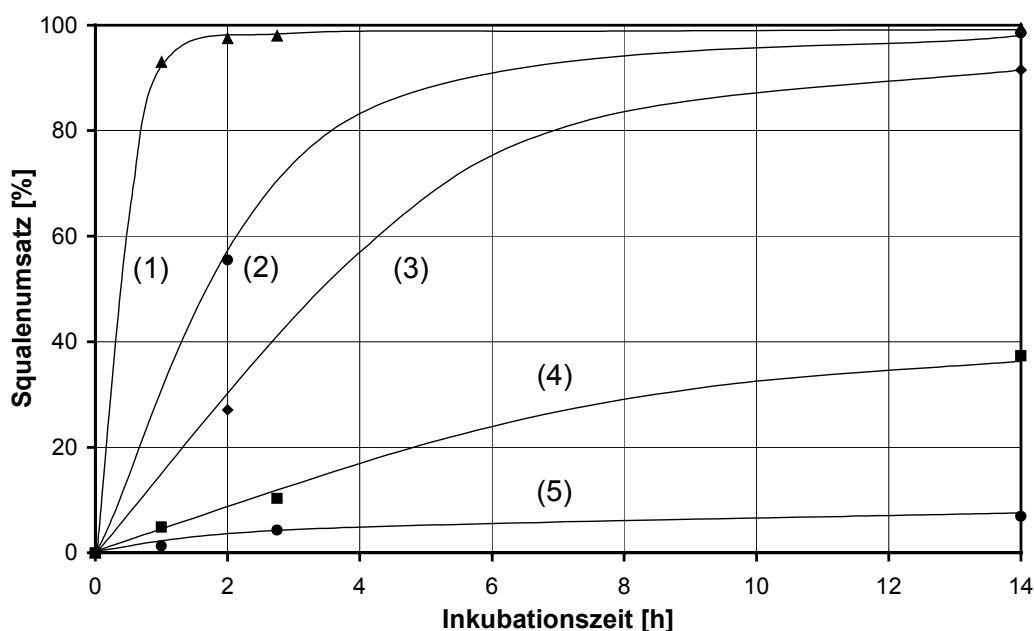


Abbildung 29: Zeitlicher Verlauf des Squalen-Umsatzes während einer Inkubationsdauer der SHC von 14 Stunden bei 50 °C nach den Daten aus Tabelle 4 & 7. WT-SHC (1), Y420A-SHC (2), F601A-SHC (3), H451A-SHC (4) und W489A-SHC (5) (Daten nach Tabelle 4 & 7).

3.4 Molecular Modelling

3.4.1 Röntgenstrukturdaten der SHC

Grundlage für das Molecular Modelling bildeten die von U. Wendt ermittelten und zur Verfügung gestellten Röntgenstrukturdaten der SHC bzw. die entsprechenden in der Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb>) hinterlegten Datensätze 1SQC, 2SQC und 3SQC. Die wichtigsten Eigenschaften und Unterschiede dieser Datensätze sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8: Eigenschaften der Datensätze zur Röntgenstruktur der SHC aus der Protein Data Bank. ⁽¹⁾: Lauryldimethylaminoxid; ⁽²⁾: n-Octyl-Tetraoxyethylen

	Datensatz		
	1SQC	2SQC	3SQC
Auflösung [Å]	2,85	2,00	2,80
Abweichung vom WT	keine	D376C/C435S	D376C
Aminosäuren	A10 – I628	A8 – R630	A10 – I628
Quartärstruktur	Monomer	Dimer	Trimer
Heteroatome	LDAO ⁽¹⁾ , H ₂ O	C ₈ E ₄ ⁽²⁾ , H ₂ O	H ₂ O

3.4.2 Aktives Zentrum der SHC

Aufgrund der Einschränkungen durch die zur Verfügung stehenden Hard- und Software wurden für die Analysen die PDB-Datensätze auf die Atomkoordinaten ausgewählter Aminosäuren des aktiven Zentrums reduziert. Dazu wurden beim Datensatz 1SQC bis auf das LDAO im aktivem Zentrum und den 45 AS in einer Entfernung von maximal 7,500 Å vom LDAO (L36, S38, M42, R127, W169, G259, G260, I261, Q262, P263, P264, Q305, A306, S307, I308, S309, W312, L316, A364, F365, Q366, D374, V375, D376, D377, T378, V380, A419, Y420, F437, D447, V448, H451, R488, W489, G490, Y495, T599, G600, F601, D604, F605, L607, Y609, Y612) alle Koordinaten der übrigen AS gelöscht. Der Datensatz 2SQC wurde ebenfalls auf diese AS reduziert, wobei an Stelle des D376 in der WT-SHC hier das C376 ausgewählt wurde (siehe **Tabelle 8**). Die Moleküle der so entstandenen neuen Datensätze wurden anschließend durch Überlagerung zur Deckung gebracht und die Datensätze in dieser Orientierung abgespeichert (1SQC_AZ.pdb und 2SQC_AZ.pdb). Beim Datensatz 2SQC_AZ.pdb mit der höheren Auflösung von 2,0 Å wurden die Koordinaten von C376 durch die von D376 aus 1SQC_AZ.pdb (WT, Auflösung nur 2,8 Å) ersetzt. Um die SHC-Produkte besser ins aktive Zentrum hineinmodellieren zu können (siehe **3.4.4**), wurden abschließend noch die LDAO-Koordinaten aus 1SQC_AZ.pdb eingefügt und als SQC_AZ.pdb abgespeichert. Dieser Datensatz wurde für alle weiteren Analysen verwendet.

3.4.3 Struktur der SHC-Produkte

Da in Datenbanken für Hopen keine Angaben zur Röntgenstrukturanalyse verfügbar waren (U. WENDT, persönl. Mitteilung), wurden von diesem Molekül sowie von den neuen Nebenprodukten der in dieser Arbeit vorgestellten SHC-Mutanten (17-Isodammara-20(21),24-dien, α - und γ -Polypodatetraen und 13 α (H)-Malabaricatrien) dreidimensionale Molekülmodelle generiert. Dafür wurde zuerst das Programm CHEM3D PRO, dann jedoch das Programm CORINA verwendet (siehe **2.8.2**). Die mit letzterem Programm erzeugten 3D-Molekülmodelle wurden für die weiteren Analysen eingesetzt.

3.4.4 Modellierung der SHC-Produkte in das aktive Zentrum der SHC

Da bisher keine Röntgenstrukturanalysen der SHC mit einem der Enzymprodukte im aktiven Zentrum durchgeführt wurden, wurde durch Molecular modelling ein 3D-Modell des Hopens (siehe **3.4.3**) in das aktive Zentrum der SHC (siehe **3.4.2**) nach den Angaben von WENDT (1997) eingefügt. Das Hopen wurde dabei mit Hilfe des LDAO als Leit-Molekül

manuell so orientiert, daß das C4 des Hopens den Platz des Stickstoffatoms des LDAO und die Methylgruppen am C4 den der N-Methylgruppen des LDAO einnehmen. Anschließend wurde das Hopensmolekül aus dieser Position geringfügig so verschoben, daß es zu keinen Überlappungen der van-der-Waals-Radien von Atomen des Hopensmoleküls und der Atome der Aminosäuren des aktiven Zentrums kommt (**Abbildung 30**).

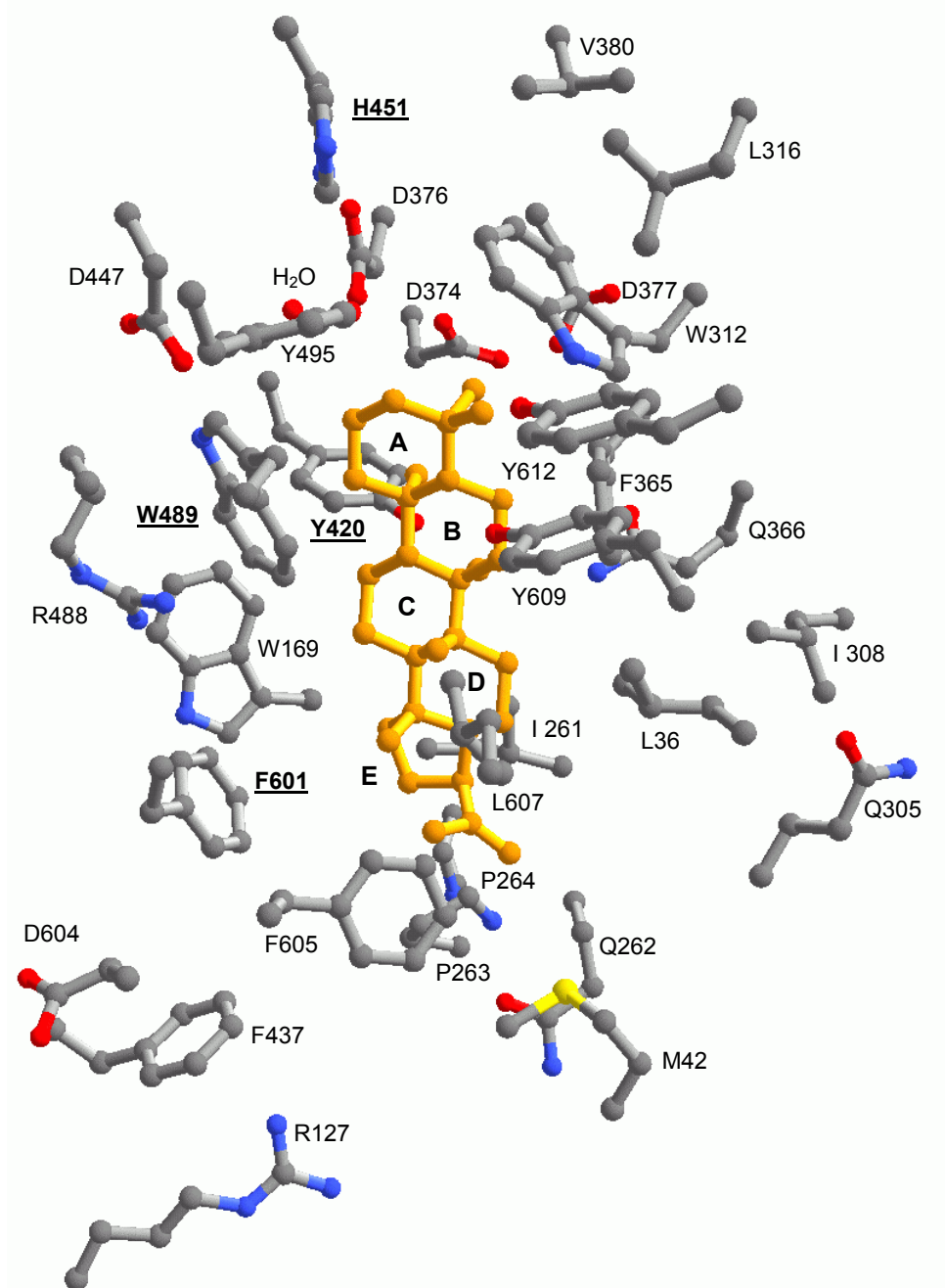


Abbildung 30: Seitenketten der Aminosäuren des aktiven Zentrums der SHC mit einem **hin-einmodelliertem Hopensmolekül**. Für eine bessere Übersichtlichkeit sind von den in 3.4.2 aufgeführten Aminosäuren sämtliche Alanin-, Glycin-, Serin-, Threonin-Reste sowie Valin375 und 448 nicht dargestellt. Die bei der Mutagenese gegen Alanin ausgetauschten Aminosäuren Y420, H451, W489 und F601 sind markiert.

Dieses 3D-Modell wurde auch dazu verwendet, um weitere Modelle des aktiven Zentrums mit den anderen charakterisierten Produkten der SHC (siehe **3.4.3**) herzustellen. Dafür wurden diese Moleküle zuerst durch eine genaue Überlagerung ihrer A- und B-Ringe mit denen des Hopenmoleküls im aktiven Zentrum angeordnet und anschließend das Hopenmolekül aus dem Datensatz gelöscht. Sterische Überlappungen der nichtcyclischen Seitenketten mit Aminosäuren des aktiven Zentrums wurden in diesen Fällen nicht weiter berücksichtigt.

3.4.5 Simulation der Mutagenesen durch Molecular Modelling

Deletionsmutanten

Der Datensatz 2SQC entspricht weitestgehend der Mutante DelN1 (Deletion von A2 bis E7; siehe **3.2.4**), da in ihm die Atomkoordinaten erst ab der darauffolgenden Aminosäuren A8 enthalten sind. Die fehlenden N-terminalen AS Met und (His)₆ wurden der Vollständigkeit halber mit dem Programm Swiss-PDBViewer hinzugefügt.

Für ein Modell der DelN2-Mutante wurden mit dem „Mutations-Tool“ desselben Programms bei 2SQC die N-terminalen AS A8 bis W32 gelöscht und die nachfolgenden AS 33 bis 39 wie folgt geändert: W33M/G34H/P35H/L36H/L37H/S38H/N39H.

Alanin-Scanning-Mutanten

Mit dem gleichen Programm wurden auch die Alanin-scanning-Mutationen (Y420A, H451A, W489A, F601A) an einem Datensatz des aktiven Zentrums der SHC mit einem hineinmodellierten Hopenmolekül oder einem der anderen Produkte der betreffenden Mutante simuliert (näheres dazu in der Diskussion, siehe **4.6**).

3.5 Limitierte Proteolyse der SHC

3.5.1 Trypsinverdau

Bei Versuchen zur limitierten Proteolyse der SHC wurde von WENDT (1994) eine bevorzugte Trypsinschnittstelle nach R234 beschrieben. Da nach der Sequenzkorrektur (siehe **3.1.1**) an dieser Position jedoch kein Arginin-Rest vorhanden ist, wurden diese Experimente wiederholt. Dafür wurde die SHC mit Rinderpankreas-Trypsin versetzt, bei 37 °C maximal 90 min inkubiert und die zu verschiedenen Zeiten aus dem Reaktionsansatz entnommenen Aliquots im SDS-Gel analysiert. Dabei konnte das durch den Proteaseverdau entstandene ca. 45 kDa-Fragment schon innerhalb der ersten Minuten nach Inkubationsbeginn identifiziert werden (siehe **Abbildung 31**). Eine zweite deutliche Proteinbande mit

einem etwas geringeren Molekulargewicht kann mit einer gewissen zeitlichen Verzögerung festgestellt werden.

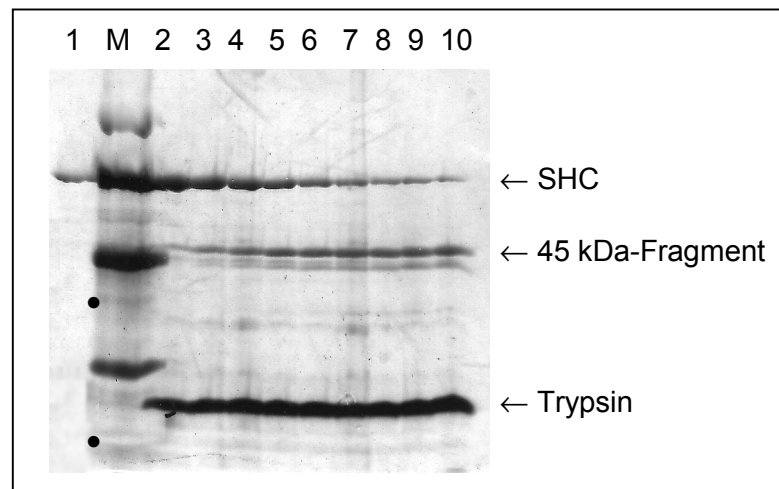


Abbildung 31: SDS-Gelanalyse eines proteolytischen Verdaus der SHC mit Trypsin. (1) SHC; M: Molekulargewichtsmarker (Banden: 94, 67, 43, 30, 20 und 14,4 kDa; Punkte markieren die schlecht sichtbaren 30 und 14,4 kDa-Banden), SHC mit Trypsin nach 0 min (2), 5 min (3), 10 min (4), 20 min (5), 30 min (6), 40 min (7), 50 min (8), 60 min (9) und 90 min (10).

3.5.2 N-terminale Ansequenzierung des SHC-Fragments

Zur Bestimmung der AS-Sequenz der Trypsinschnittstelle wurde das 45 kDa-Fragment isoliert und für die N-terminale Ansequenzierung durch Edman-Abbau verwendet (siehe 2.6.15). Die schrittweise freigesetzten AS konnten durch HPLC-Analyse identifiziert werden:

Tabelle 9: Identifizierung der N-terminalen Aminosäuren des durch Trypsinverdaus entstandenen 45 kDa-SHC-Fragmentes. Die Identifizierung der Aminosäuren erfolgte in der Reihenfolge ihrer Freisetzung durch den Edman-Abbau. Bei nicht eindeutig identifizierbaren AS ist die wahrscheinlichere Charakterisierung zuerst aufgeführt.

Aminosäure	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Charakterisierung	A	A > L	E > Q / H	I > G	R > Y	A > Q	L / K	D	?	L

Mit den durch den Edman-Abbau bestimmten AS konnten zwei engbenachbarte Trypsinschnittstellen in der korrigierten AS-Sequenz der SHC identifiziert werden (siehe **Tabelle 10**).

Tabelle 10: Charakterisierung der identifizierten Trypsinschnittstellen in der SHC-Sequenz. Vom Ergebnis des Edman-Abbaues abweichende AS in der SHC-Sequenz sind unterstrichen.

Sequenz der Schnittstelle	Molekulargewicht des	
	N-terminalen Fragments	C-terminalen Fragments
R223 A L H G Y Q K <u>L</u> <u>S</u> <u>V</u>	25,7 kDa	45,8 kDa
R238 A A E I R A L D <u>W</u> L	27,5 kDa	44,0 kDa

3.6 Oligomerisierung der SHC unter nativen Bedingungen

3.6.1 Gelfiltrationschromatographie

Zur Bestimmung des Oligomerenstatus der SHC in einer detergenzfreien Lösung wurde die durch Anionenaustauschchromatographie gereinigten WT-SHC (siehe 3.3.2) für eine Analyse durch Gelfiltrationschromatographie eingesetzt (siehe 2.6.12). Aufgrund der geringen Flußrate mußten die verschiedenen Läufe mit den Eichproteinen und der Cyclasen an mehreren aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt werden. Dabei erwies sich die Pumpengeschwindigkeit bei kleinsten Drehzahlen als nicht konstant. Da jedoch gleiche Proteine in den verschiedenen Läufen verwendet wurden, konnten Korrekturfaktoren berechnet werden, um damit die Flußratenabweichungen herauszurechnen. Wie aus der **Abbildung 31** hervorgeht, kann für die detergenzfreie SHC mit einem Elutionsvolumen von 74 ml ein Molekulargewicht von ca. 442 kDa bestimmt werden, was etwa einem Hexamer entspricht.

3.6.2 FPLC-Analysen

Zur Überprüfung des Ergebnisses der Gelfiltrationschromatographie wurde das Molekulargewicht detergenzfreier SHC zusätzlich noch durch FPLC-Analysen bestimmt (siehe 2.6.13). Wie aus der **Abbildung 32** hervorgeht, wurde auch hier bei einem Elutionsvolumen von 10,89 ml mit Molekulargewicht des SHC-Oligomers von ca. 453 kDa ein vergleichbares Ergebnis erzielt.

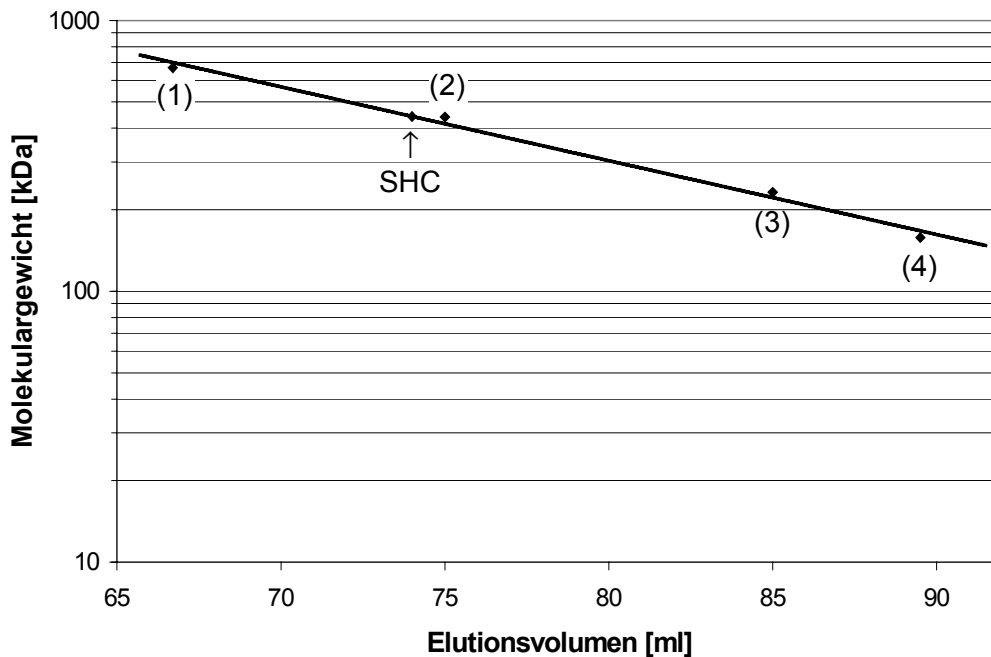


Abbildung 32: Eichgerade zur Gelfiltrationschromatographie. Folgende Eichproteine wurden verwendet: **(1)** Thyroglobulin [669 kDa], **(2)** Ferritin [440 kDa], **(3)** Catalase [232 kDa] und **(4)** Aldolase [158 kDa]. Das Elutionsvolumen der SHC ist auf der Eichgerade markiert.

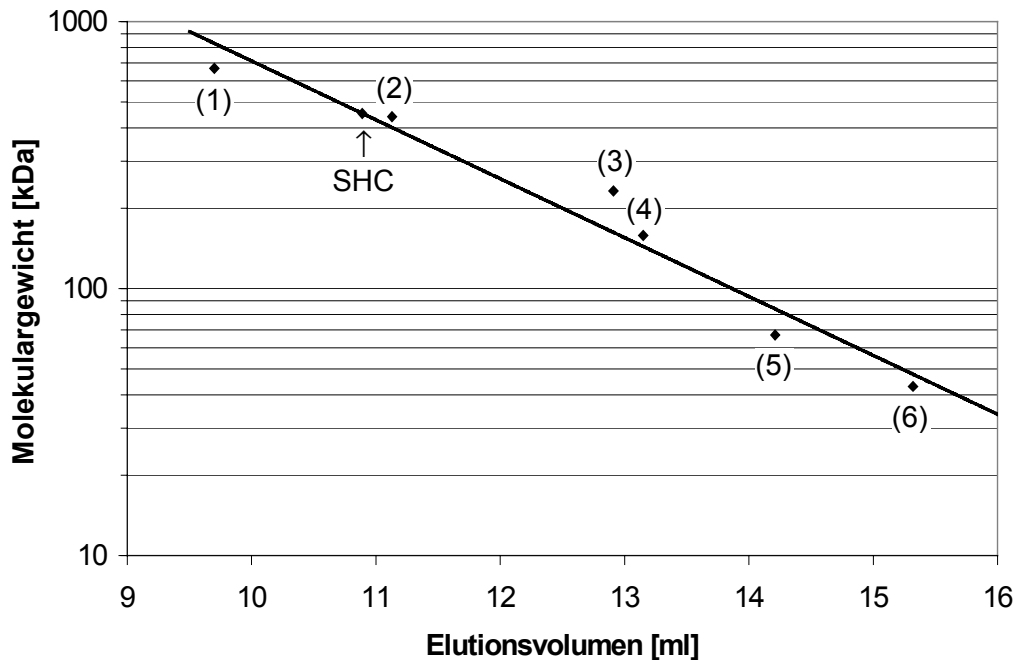


Abbildung 33: Eichgerade zur FPLC-Analyse. Folgende Eichproteine wurden verwendet: **(1)** Thyroglobulin [669 kDa], **(2)** Ferritin [440 kDa], **(3)** Catalase [232 kDa]; **(4)** Aldolase [158 kDa]; **(5)** BSA [67 kD] und **(6)** Ovalbumin [43 kDa]. Das Elutionsvolumen der SHC ist auf der Eichgerade markiert.

4 Diskussion

4.1 Die Sequenz der SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius*

Die Triterpen-Cyclasen und die von ihnen katalysierten Reaktionen sind schon seit einem halben Jahrhundert Gegenstand intensiver Forschung. In den ersten Jahrzehnten konzentrierten sich die Arbeiten hauptsächlich darauf, durch Verfütterung markierter Substrate und die anschließende Isolierung und Analyse der gebildeten Produkte die Stoffwechselwege in ganzen Organismen oder Organen aufzuklären. Ab den 1980iger Jahren ging man dann zunehmend dazu über, statt kompletter Biosynthesewege nun einzelne der dabei beteiligten Enzyme zu isolieren und zu analysieren. Dadurch konnten in den letzten Jahren wesentliche Erkenntnisse über die Funktion und Regulation dieser Enzyme gewonnen werden (CANE, 1999).

Bei den meisten Triterpen-Cyclasen lief dieser Erkenntnisgewinn in ähnlichen Phasen ab. Am Beginn stand die Isolierung und Aufreinigung der Enzyme aus Rohextrakten und deren anschließende biochemische Charakterisierung. Als erste Triterpen-Cyclase wurde die Squalen-Hopen-Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* 1986 isoliert (SECKLER & PORALLA, 1986; NEUMANN & SIMON, 1986). Die ersten eukaryotischen Oxidosqualen-Cyclasen wurden in den darauffolgenden Jahren isoliert (BUNTEL & GRIFFIN, 1992; COREY *et al.*, 1993).

In der zweiten Phase wurden dann die Gene der Triterpen-Cyclasen isoliert, kloniert und sequenziert. Am Beginn stand wieder die SHC aus *A. acidocaldarius*, deren Gen 1990 isoliert wurde (OCHS, 1990; OCHS *et al.*, 1992). Die erste Lanosterol-Cyclase wurde 1992 aus *Candida albicans* (BUNTEL & GRIFFIN, 1992), die erste pflanzliche Cycloartenol-Cyclase ein Jahr später aus *Arabidopsis thaliana* isoliert (COREY *et al.*, 1993). Zwar wurden auch in den Folgejahren gezielt weitere Gene von Triterpen-Cyclasen kloniert, doch wurde deren Zahl inzwischen durch die bei Genomprojekten gefundenen Sequenzen (potentieller) Triterpen-Cyclasen bei weitem übertroffen. So wurden bis 1997 insgesamt sechs SHC-Gene kloniert, denen inzwischen mehr als dreißig SHC-Sequenzen aus Genomsequenzierungen gegenüberstehen (siehe unten). Offen bleibt dabei jedoch, ob diese potentiellen Cyclasen *in vivo* auch exprimiert werden und welche Funktion die entsprechenden Genprodukte im Organismus haben. Die Lösung dieser Fragen gehört zu den Aufgaben der Proteomforschung in den nächsten Jahren.

Mit den isolierten Gensequenzen wurde dann auch die dritte Phase mit der Etablierung von Expressionssystemen und der molekularbiologische Untersuchung der Cyclasen durch gezielte Mutagenese möglich.

Die letzte Phase mit der Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse der Triterpen-Cyclasen war bisher nur bei der SHC aus *A. acidocaldarius* erfolgreich (WENDT, 1997; WENDT *et al.*, 1997; LENHART *et al.*, 2003; REINERT *et al.*, 2004). Bei den eukaryotischen Oxidosqualen-Cyclasen scheiterte dies bisher unter anderem daran, daß diese Enzyme instabil und in *E. coli* nicht funktionell überexprimiert werden können (HOSHINO & SATO, 2002). Erst nachdem kürzlich über die erfolgreiche Überexpression der humanen OSC in der Hefe *Pichia pastoris* berichtet wurde (RUF *et al.*, 2004), kann jetzt wahrscheinlich auch bei den eukaryotischen Triterpen-Cyclasen in absehbarer Zeit mit derartigen Fortschritten gerechnet werden.

Wie oben erwähnt, wurde die erste Squalen-Hopen-Cyclase aus *A. acidocaldarius* isoliert. Im Verlauf dieser Arbeit kamen dann mehrere weitere bakterielle Squalen-Cyclasen hinzu. Dadurch standen zunehmend mehr Proteinsequenzen zur Verfügung, mit denen die der SHC aus *A. acidocaldarius* verglichen werden konnte. Während die anderen SHC über den gesamten Sequenzbereich Homologien aufwiesen, konnten bei der SHC von *A. acidocaldarius* im N-terminalen Bereich doch deutliche Sequenzabweichungen festgestellt werden. Durch genauere Sequenzvergleiche konnte der Bereich mit der abweichenden Aminosäuresequenz auf die Region zwischen den Aminosäuren 70 und 240 eingeschränkt werden (siehe 3.1.1). Die wahrscheinlichste Ursache für eine derartige Sequenzabweichung ist ein Fehler bei der DNA-Sequenzierung des SHC-Gens bei *A. acidocaldarius*. Eine von allen anderen Bakterien abweichende evolutionäre Entwicklung der SHC bei diesem Organismus, die zu einer derartig veränderten N-terminalen Aminosäuresequenz führt, ist dagegen wesentlich unwahrscheinlicher. Deshalb wurde die DNA-Sequenz des SHC-Gens und die davon in allen drei Leserastern ableitbaren Aminosäuresequenzen näher analysiert und mit den Sequenzen anderer bakterieller Cyclasen verglichen. Dabei zeigte sich, daß in dem Sequenzabschnitt, in dem die *A. acidocaldarius*-SHC von den anderen Enzymen abwich, in den verschiedenen Leserastern Aminosäuresequenzen auftauchten, die eine wesentlich größere Sequenzübereinstimmung aufwiesen. Dieser Hinweis, daß tatsächlich Leserastersprünge in der ursprünglichen SHC-Sequenz die Ursache für die beobachteten Sequenzabweichungen sind, wurde durch eine partielle DNA-Sequenzierung des SHC-Gens verifiziert. Dazu wurde entsprechend der DNA-Sequenz vor bzw. nach dem Bereich mit der Abweichung zu den Sequenzen der anderen Cyclasen ein Primerpaar konstruiert (Aa-

Seq1/AaSeq2) und damit dieser Sequenzabschnitt mehrfach sequenziert. Dabei wurden im Vergleich zur ursprünglichen DNA-Sequenz sechs zusätzliche Nukleotide sowie drei Nukleotidsubstitutionen entdeckt. Da sich diese Änderungen über den gesamten sequenzierten Bereich verteilten, führte dies zu einer 163 AS umfassenden neuen Sequenz zwischen den Aminosäuren D75 und A239.

Nach diesem Ergebnis wurden die Sequenzierdaten, die bis dahin bei Mutageneseexperimenten mit der SHC von *A. acidocaldarius* angefallen waren, ebenfalls nach Hinweisen auf Abweichungen gegenüber der ursprünglich publizierten SHC-Sequenz überprüft. Auch hier konnten sechs Insertionen und zwei Nukleotidsubstitutionen festgestellt werden (C. FEIL, persönliche Mitteilung). Da diese Änderungen jedoch engbenachbarte Sequenzbereiche betraf, führten sie zu wesentlich geringeren Änderungen der AS-Sequenz (G269 → A271; P320 → R322/A323; P391/Q392 → R394/R395/R396).

Zusätzlich fiel bei der Aufklärung der Röntgenstruktur der SHC auf, daß die gemessenen Elektronendichten im C-terminalen Bereich nicht mit der von OCHS publizierten AS-Sequenz in Übereinstimmung zu bringen waren (U. WENDT, persönliche Mitteilung). Durch die Sequenzierung des betreffenden Genbereichs konnten die letzten drei Nukleotidsubstitutionen festgestellt werden, die zu einer geänderten Sequenz (S597/P598 → G600/F601) führen.

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Mutagenesen wurden mehrere Fragmente des SHC-Gens in pUC18 subkloniert (siehe **3.1.1**). Zur Kontrolle wurden sämtliche Inserts der so erzeugten Plasmide, die zusammen den Bereich der letzten 342 AS der SHC entsprechen, zur Kontrolle vollständig sequenziert. Sowohl hierbei als auch bei einer kompletten Neusequenzierung des SHC-Gens in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G.E. SCHULZ, Universität Freiburg i. Br. (G. ZIEGLER & O. WITTEKINDT; persönliche Mitteilung) sowie der davon unabhängig durchgeführten Isolierung und Klonierung des SHC-Gens aus *A. acidocaldarius* JCM 5260 in der Arbeitsgruppe von T. HOSHINO, Niigata University, Japan (SATO *et al.*, 1998a) konnten außer den oben beschriebenen Sequenzänderungen keine weiteren Abweichungen festgestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse und der Übereinstimmung der neuen Sequenz mit den Daten der Röntgenstrukturanalyse kann die korrigierte Version der SHC-Sequenz (siehe **Abbildung 9**) nun als die gesicherte WT-Sequenz der SHC von *A. acidocaldarius* angesehen werden.

Insgesamt wurden also bei der Sequenzüberprüfung über die gesamte AS-Sequenz verteilt 12 zusätzlich Nukleotide festgestellt. Dadurch verlängert sich die korrigierte AS-Sequenz um vier zusätzliche Aminosäuren auf eine Länge von jetzt 631 AS. Durch alle zusätzlichen

Nukleotide und die bei der Überprüfung ebenfalls gefundenen neun Nukleotidsubstitutionen weist die SHC von *A. acidocaldarius* jetzt an 171 von 631 AS-Positionen (27,1 %) eine neue Sequenz auf.

Die Änderungen der AS-Sequenz im Vergleich zu der ursprünglich von OCHS beschriebenen Sequenz haben unterschiedliche Auswirkungen. Am geringsten wirken sich die Sequenzänderungen auf das Molekulargewicht der SHC aus, welches nur gering von 69,4 auf 71,5 kDa ansteigt. Schon deutlicher wirken sich die Sequenzänderungen dagegen auf die AS-Zusammensetzung der SHC aus. So sind in der korrigierten Sequenz jetzt 17 Arginin-Reste weniger vorhanden. Der von OCHS mit 10,5 % als sehr hoch beschriebene Anteil reduziert sich damit auf 7,8 %. Auch die Zahl der Alanin- und Serin-Reste wird deutlich um jeweils 13 bzw. 12 reduziert. Deutlich zugenommen hat dagegen die Zahl der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, die jetzt auf einen Anteil von zusammen 12,5 % kommen. Ähnliche Werte sind auch bei anderen SHC gefunden worden: so z.B. 12,4 % bei der SHC von *Methylococcus capsulatus* (TIPPELT 1997), 11,1 % bei *Alicyclobacillus acidoterrestris* (CHOI, 1995) und 10,4 % bei *Bradyrhizobium japonicum* (PERZL, 1996). Dieser hohe Anteil aromatischer AS ist damit ein charakteristisches Merkmal der SHC. Da zudem zahlreiche Aromaten in den verschiedenen Cyclasen konserviert sind, wurde schon vor der Röntgenstrukturaufklärung der ersten SHC vermutet, daß einige dieser Aminosäuren Bestandteil des aktiven Zentrum sind und an der Stabilisierung der bei der Cyclisierungsreaktion auftretenden intermediären Carbokationen beteiligt sind (PORALLA *et al.*, 1994; DOUGHERTY, 1996; LESBURG *et al.*, 1998). Diese Funktion konnte experimentell durch Mutagenese dieser Aminosäuren inzwischen bestätigt werden (siehe 4.5; MERKOFER *et al.*, 1999, PALE-GROSDÉMANGE *et al.*, 1999; FÜLL & PORALLA, 2000). Vor allem durch diese Zunahme der aromatischen AS (zusätzlich aber auch die einiger anderer AS) steigt der Anteil der hydrophoben AS deutlich um 44 und erreicht jetzt einen Anteil von 34,7 % (siehe **Tabelle 1**).

Am deutlichsten wirkt sich die Sequenzkorrektur auf die Übereinstimmung mit den Sequenzen anderer bakterieller Squalen-Hopen-Cyclasen aus. Zeigte die alte Sequenz im fehlerhaften Bereich im Durchschnitt weniger als 15 % Identität bzw. nur rund 20 % Ähnlichkeit zur Sequenz der SHC aus *A. acidoterrestris* (siehe **Abbildung 8**), so werden nach der Sequenzkorrektur in beiden Fällen um rund 40 % höhere Werte erreicht. Damit zeigt der korrigierte Sequenzbereich jetzt ein vergleichbares Maß an Übereinstimmung wie die davor- und danachliegenden Sequenzbereiche. Auch im Vergleich zu den SHC-Sequenzen

anderer Bakterien werden jetzt – abgestuft nach Verwandtschaftsgrad zwischen den Sequenzen – deutlich höhere Sequenzübereinstimmungen erreicht (siehe **Tabelle 2**).

Abschließend soll noch kurz analysiert werden, welche Gründe möglicherweise dazu geführt haben, daß die 1990 veröffentlichte Sequenz der SHC fehlerhaft war und warum es einige Jahre gedauert hat, bis dieser Fehler entdeckt wurde. Schon von OCHS (1990) wurde darauf hingewiesen, daß die Sequenzierung des SHC-Gens teilweise äußerst problematisch war. Diese Probleme wurden auf den in manchen Genabschnitten extrem hohe GC-Gehalt der DNA von z. T. über 95 % zurückgeführt. Zwei der drei von OCHS als Beispiele aufgeführten Sequenzbereiche, die von ihm nur mit Hilfe modifizierter Nukleotide sequenziert werden konnten, gehören auch tatsächlich zu den Abschnitten des SHC-Gens, bei denen bei der Sequenzüberprüfung im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine veränderte Sequenz festgestellt werden konnte.

Zusätzlich werden wohl auch technische Gründe eine Rolle bei der fehlerhaften Sequenzbestimmung gespielt haben. So wurde die Sequenzierreaktion von OCHS noch mit radioaktiv markierten Primern durchgeführt und zur Dokumentation wurden mit den im Gel aufgetrennten Sequenzen Röntgenfilme durch Autoradiographie belichtet, die anschließend visuell ausgewertet wurden. Im Gegensatz dazu wurden bei der Nachsequenzierung im Rahmen dieser Arbeit fluoreszenzmarkierte Primer eingesetzt und die Bestimmung der Nukleotidsequenz erfolgte vollautomatisch mit Hilfe eines Automated Laser Fluorescent A.L.F.TM DNA Sequencers (siehe **2.4.10**). Die automatische Signalauswertung macht sicherlich eine höhere Sensitivität und damit einhergehend auch ein geringer Fehleranfälligkeit der Auswertung möglich, als es bei einer rein visuellen Auswertung der Fall ist.

Mehrere Gründe haben dazu beigetragen, daß es fünf Jahre gedauert hat, bis der Fehler in der Gensequenz der SHC von *A. acidocaldarius* festgestellt wurde. Als die Sequenz 1990 erstmals bestimmt wurde, konnten bei Datenbankrecherchen keine homologen Sequenzen gefunden werden (OCHS, 1990). Die fehlerhafte Sequenz im N-terminalen Bereich dieser SHC konnten deshalb solange nicht durch Vergleiche mit anderen verwandten Sequenzen entdeckt werden, bis einige Jahre später mehrere Sequenzen anderer SHC und OSC zum Vergleich zur Verfügung standen. Auch nachdem ein Vergleich mit anderen Cyclasen möglich wurde, fiel die Abweichung in der Sequenz von *A. acidocaldarius* nicht sofort ins Auge, da generell bei allen Triterpen-Cyclasen der N-terminalen Bereich einen deutlich geringer Konservierungsgrad als der C-terminalen Bereich aufweist. Erschwerend kam noch hinzu, daß der fehlerhafte Sequenzbereich zwischen den QW-Motiven 5c und 5b lag. Somit fehlten durch die fehlerhafte Sequenz auch keine konservierten Sequenzmotive, was

einen Hinweis auf eine Sequenzabweichung hätte liefern können. Das gleiche galt auch für die Analyse der SHC durch SDS-PAGE, da sich das aus der falschen Sequenz abgeleitete Molekulargewicht der SHC mit 69,4 kDa kaum vom tatsächlichen Molekulargewicht von 71,5 kDa unterschied und dieser kleine Molekulargewichtsunterschied im Gel leicht übersehen werden konnte. Schließlich wurde die Sequenzabweichung auch deshalb so lange nicht entdeckt, da in den darauffolgenden Jahren der N-terminale Genbereich nicht erneut sequenziert wurde. So unterblieb die schon von OCHS aufgrund der aufgetretenen Probleme empfohlene Nachsequenzierung und die von FEIL im Rahmen ihrer Mutageneseexperimente durchgeführten Sequenzierungen betrafen ausschließlich mehr C-terminal gelegene Sequenzbereiche.

4.2 Sequenzvergleich und Evolution der Triterpen-Cyclasen

Zum Zeitpunkt der Korrektur der SHC-Sequenz von *A. acidocaldarius* standen für Sequenzvergleiche nur jeweils eine Handvoll weiterer SHC- und OSC-Sequenzen zur Verfügung. Inzwischen sind auch durch die rasanten Fortschritte bei der Sequenzierung ganzer Genome in den letzten Jahren eine Vielzahl weiterer Sequenzen von Triterpen-Cyclasen dazugekommen. Aus diesem Grund wurde der Sequenzvergleich der SHC aus *A. acidocaldarius* auch auf diese Sequenzen ausgedehnt, um dabei möglicherweise neue Erkenntnisse über die Evolution der Triterpen-Cyclasen gewinnen zu können. Dafür wurden alle potentiellen Squalen-Cyclasen sowie der größte Teil der Oxidosqualen-Cyclasen verwendet, deren Sequenzen bis Ende 2003 in der GenBank am National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html>) verfügbar waren. Von zwei Ausnahmen abgesehen (näheres dazu siehe unten) wurden die DNA-Sequenzen aus den zahlreichen noch nicht abgeschlossenen Genomprojekten in den Datenbanken der verschiedenen Forschungszentren nicht nach möglicherweise dort vorhandenen Cyclase-Genen durchsucht.

Durch die Genomanalysen hat sich in den letzten Jahren herausgestellt, daß auch bei Prokaryoten zahlreiche Gene in mehreren Kopien vorhanden sind, was von den Eukaryoten schon länger bekannt ist. Zu diesen Multicopy-Genen gehören z. B. bei *Rhodopirellula baltica* (= *Pirellula* sp. 1) 25,4 % (GLÖCKNER *et al.*, 2003), bei *Bacillus subtilis* 30 % (KUNST *et al.*, 1997) und bei *Methanosarcina acetivorans* sogar 49 % aller Gene (GALAGAN *et al.*, 2002). Wie die Ergebnisse der Genomsequenzierungen zeigen, sind in einigen Organismen auch Cyclase-Sequenzen mehrfach vorhanden, so z. B. bei *Rhodopirellula baltica*, wo fünf SHC-homologe Sequenzen gefunden wurden, die Proteinen aus

350, 355, 384, 462 und 661 Aminosäuren entsprechen. Auch das Genom von *Geobacter sulfurreducens* (METHE *et al.*, 2003) enthält zwei potentielle SHC-Gene, die für 679 bzw. 730 AS lange Proteine codieren. Für die Sequenzanalyse der Triterpen-Cyclasen wurde jedoch pro Organismus nur jeweils eine Cyclase-Sequenz verwendet. Ausnahmen wurden nur dort gemacht, wo es sich um unterschiedliche Triterpen-Cyclasen handelt. Nähere Angaben zu den jeweils ausgewählten Sequenzen sind im **Anhang** zusammengestellt.

Da von vielen Triterpen-Cyclasen nur die Gensequenz bekannt ist, ist damit vollkommen ungeklärt, ob das Gen im jeweiligen Organismus überhaupt exprimiert wird und welche *in vivo*-Aktivität die jeweilige Cyclase aufweist. Ungeachtet dessen werden im Folgenden trotzdem alle Sequenzen als Triterpen-Cyclasen behandelt und aufgrund ihrer Sequenzhomologie einer der bekannten Gruppen von Triterpen-Cyclasen (siehe **Abbildung 4**) zugeordnet.

Insgesamt wurden 74 Sequenzen berücksichtigt, die sich auf 32 Squalen-Hopen-Cyclasen und 42 Oxidosqualen-Cyclasen, darunter 13 Lanosterol-, 14 Cycloartenol-, fünf Lupeol-, acht β -Amyrin-, eine α -Amyrin- und eine Isomultiflorenol-Cyclase(n), verteilen. Das Alignment dieser Sequenzen wurde mit CLUSTALX 1.81 erstellt und das Ergebnis durch ein Realignment der Sequenzen im Bereich des QW5c-Motivs (siehe **Anhang**) verbessert. Für die Erstellung eines Dendrogramms wurde die Neighbour-Joining-Methode (SAITOU & NEI, 1987) verwendet. Das Dendrogramm wurde mit TREEVIEW 1.6.6 unter Verwendung der Funktion „root with outgroup“ dargestellt, wobei als „outgroup“ die Sequenz von *Methanosarcina acetivorans* aufgrund ihrer geringsten Übereinstimmung mit den restlichen Cyclasen definiert wurde (siehe **Abbildung 34**). Auf eine Verifizierung des Ergebnisses durch Verwendung anderer Phylogenie-Programme wurde verzichtet.

Im Dendrogramm der Triterpen-Cyclasen verteilen sich die Sequenzen auf insgesamt drei Hauptgruppen. Die erste und kleinste wird von den Sequenzen der Squalen-Hopen-Cyclasen der *Archaea*, *Rhodopirellula* und *Desulfotobacterium* gebildet. Die zweite Gruppe wird von allen weiteren SHC gebildet und die verschiedenen Oxidosqualen-Cyclasen bilden zusammen die dritte Gruppe.

Die Squalen-Cyclasen der ersten Gruppe weisen die geringsten Ähnlichkeiten zu den Sequenzen aller restlichen Cyclasen auf. Ganz besonders interessant ist hier der Nachweis SHC-homologer Sequenzen bei den drei Vertretern der *Archaea*, da aus dieser Organismengruppe bisher noch keine Hopanoid-synthetisierende Arten bekannt sind. Zwar kommen in den Membranlipiden der *Archaea* verschiedene Isoprenoide (C_{20} -, C_{25} - C_{40} -Isoprenoid-Glycerol-Ether, C_{50} -Carotinoide (Bacterioruberine), Squalen und verschiedene

Dehydrosqualene) vor, jedoch sind bisher keine cyclischen Triterpene in diesen Organismen gefunden worden (TAYLOR, 1984; ROHMER *et al.*, 1984; OURISSON *et al.*, 1987). Obwohl die Sequenzen der drei Arten nur durchschnittlich 5-10 % Identität und 12-20 % Ähnlichkeit zu den anderen SHC aufweisen, kann eine Verwandtschaft dieser Sequenzen mit den anderen bakteriellen SHC angenommen werden, da die wenigen konservierten Aminosäuren hauptsächlich in rudimentären QW-Motiven vorkommen, welche bis heute mit Ausnahme der *ent*-Kauren-Synthase aus *Arabidopsis* ausschließlich aus Triterpen-Cyclasen bekannt sind (PORALLA *et al.*, 1994). Auch das ebenfalls für Triterpen-Cyclasen charakteristische aspartatreiche Motiv ist zumindest bei der Sequenz aus *Methanosarcina acetivorans* (Sequenz [29] in **Abbildung 34**) rudimentär vorhanden. Die geringen Sequenzübereinstimmungen lassen verschiedene Interpretationsmöglichkeiten zu. Entweder handelt es sich hier tatsächlich um Squalen-Cyclasen, die sich nur durch eine deutlich abweichende Sequenz von allen anderen bekannten SHC unterscheiden. Daß dies bei den *Archaea* durchaus der Fall sein kann, wird am Beispiel der Squalen-Synthasen deutlich. Obwohl Squalen in zahlreichen *Archaea* nachgewiesen wurde, konnte in den 17 bisher vollständig sequenzierten *Archaea*-Genomen nur bei *Halobacterium* sp. NRC-1 (NG *et al.*, 2000) das Gen einer Squalen-Synthase gefunden wurde. Andererseits ist vorstellbar, daß diese Sequenzen zwar von Squalen-Cyclasen abstammen, im Lauf der Evolution der *Archaea* aber völlig neue Enzymaktivitäten entwickelt haben. Zur Klärung dieser Fragen müßten die Proteine isoliert und ihre Enzymaktivität genauer analysiert werden. Möglicherweise stellen diese Sequenzen aber auch nur noch rudimentäre Reste ehemals funktionsfähiger SHC-Gene dar, die überhaupt keine Enzymaktivität mehr aufweisen. Dafür spricht, daß es sich hier um die kürzesten Sequenzen der Triterpen-Cyclasen handelt und Hopanoide bei diesen Arten bisher nicht nachgewiesen wurden. Da bei den *Archaea* Etherlipide die Membranstabilisierung übernehmen, bestand vielleicht keine Notwendigkeit für den Erhalt funktionsfähiger Gene der Hopanoid-Biosynthese in der Evolution dieser Arten. Merkwürdig ist jedoch, daß ausgerechnet bei *Methanosarcina acetivorans* [29] mit dem mit 5,75 Mbp bisher größten sequenzierten *Archaea*-Genom die am stärksten reduzierte Cyclase-Sequenz vorhanden ist. Während hier das Protein nur 412 AS umfaßt, sind die Proteinsequenzen bei den beiden anderen Archaeen, die wesentlich kleinere Genome besitzen (1,69 Mbp bei *Methanopyrus kandleri* [31] und 1,76 Mbp bei *Pyrococcus abyssi* [30]), mit 558 bzw. 690 AS wesentlich größer. Sollte es sich hier tatsächlich um funktionslose DNA-Sequenzen handeln, dann sollte man erwarten, daß diese für den Organismus sinnlos gewordenen Sequenzen um so eher deletiert werden, je kleiner das Genom ist.

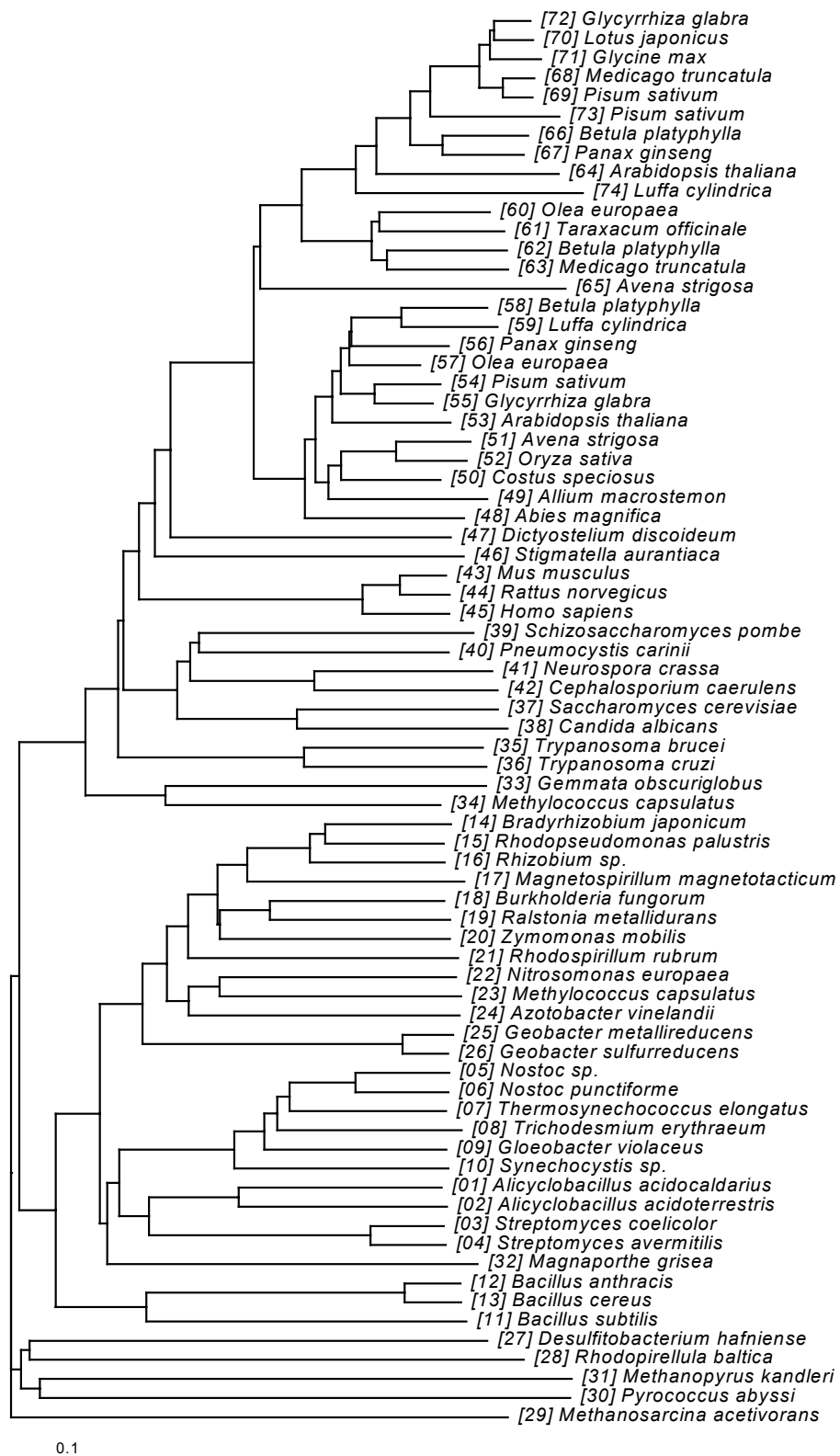


Abbildung 34: Dendrogramm der pro- und eukaryotischen Triterpen-Cyclasen: [01]–[33]: Squalen-Hopen-Cyclasen; [33]–[45]: Oxidosqualen-Lanosterol-Cyclasen; [46]–[59]: Oxidosqualen-Cycloartenol-Cyclasen; [60]–[64]: Oxidosqualen-Lupeol-Cyclasen; [65]–[72]: Oxidosqualen- β -Amyrin-Cyclasen; [73]: Oxidosqualen- α -Amyrin-Cyclase; [74]: Oxidosqualen-Iso-multiflorenol-Cyclase. Maßstab: 0,1 Aminosäuresubstitutionen pro Sequenzposition. Das Dendrogramm wurde mit den Programmen CLUSTALX und TREEVIEW erstellt. Für weitere Angaben zu den verwendeten Sequenzen und dem diesem Dendrogramm zugrundeliegendem Sequenzalignment siehe **Anhang.**

Die beiden anderen Cyclasen in dieser Gruppe mit stark abweichenden SHC-Sequenzen stammen aus *Desulfitobacterium hafniense* [27] und *Rhodopirellula baltica* [28] (bisher *Pirellula* sp. 1; GLÖCKNER *et al.*, 2003). Beide Sequenzen weisen im Vergleich zu den *Archaea*-Sequenzen mit 12-16 % Identität und 21-25 % Ähnlichkeit etwas höhere Sequenz-übereinstimmungen mit den restlichen SHC auf. Da die Genomsequenzierung von *Desulfitobacterium* bisher noch nicht abgeschlossen ist, sind auch noch keine Aussagen möglich, ob die Gene dieser Art im größeren Ausmaß nur geringe Homologien zu den entsprechenden Sequenzen anderer Organismen aufweisen. Dies wäre ein Hinweis auf eine isolierte phylogenetische Stellung dieser Art, die dem Phylum *Firmicutes*, Ordnung *Clostridiales* (GARITTY & HOLT, 2001) zugeordnet wird. Mit nur 529 AS besitzt *Desulfitobacterium* nach *Methanosarcina* die kürzeste SHC-Sequenz.

Von den fünf SHC-Sequenzen bei *Rhodopirellula* wurde die mit 661 AS längste Sequenz für das Alignment verwendet, da sie die meisten Übereinstimmungen mit den anderen Cyclasen aufweist. Die anderen teilweise erheblich kürzeren Sequenzen dürfte von ehemaligen SHC-Genen im Genom abstammen, inzwischen aber zu funktionslose Sequenzen reduziert worden sein. Die geringe Homologien zu den entsprechenden Sequenzen bei anderen Organismen ist jedoch nicht nur auf die SHC-homologen Sequenzen beschränkt. Insgesamt findet man bei mehr als der Hälfte aller Gene dieses Bakteriums keine oder nur minimale Ähnlichkeiten zu Sequenzen in den verschiedenen Datenbanken. Dies wird darauf zurückgeführt, daß es sich bei den *Planctomyces* um eine der Gruppen handelt, die sich in der Evolution der *Bacteria* am frühesten von allen restlichen Gruppen abgespalten haben. Der geringe Homologiegrad dokumentiert somit die isolierte phylogenetische Stellung dieser Organismen (GLÖCKNER *et al.*, 2003). Außer den oben genannten SHC-Sequenzen enthält die GenBank noch eine Sequenz einer potentiellen Oxidosqualen-Cycloartenol-Cyclase aus *Rhodopirellula* (GenBank Acc. No. NP_864256). Diese Sequenz tritt im Alignment jedoch nicht im Cluster der pflanzlichen Cycloartenol-Cyclasen auf und die Ähnlichkeit zu Cycloartenol-Cyclasen ist mit Ausnahme der Enzyme aus *Olea europaea* und *Medicago truncatula* grundsätzlich niedriger als die Ähnlichkeit zu den Squalen-Hopen-Cyclasen. Aus diesem Grund wird es sich hier wohl eher um eine weitere SHC-Sequenz aus diesem Organismus handeln. Dafür spricht auch, daß diese Sequenz im Dendrogramm der Triterpen-Cyclasen die gleiche Position wie die Sequenz [28] einnimmt, weshalb diese Sequenz für die **Abbildung 34** nicht berücksichtigt wurde.

Alle andere Squalen-Cyclasen bilden zusammen eine Gruppe, die sich in drei Subcluster unterteilen läßt, die jeweils von den Sequenzen der folgenden *Bacteria* gebildet werden:

(1) *Bacillus*, (2) *Cyanobacteria* und gram-positive *Bacteria* (*Alicyclobacillus*, *Streptomyces*) sowie (3) gram-negative *Proteobacteria*.

Die isolierte Stellung der SHC-Sequenzen der drei *Bacillus*-Arten zeigt sich durch deutliche Sequenzabweichungen im Vergleich zu den anderen gram-positiven *Bacteria*. So fehlt ihrem QW5c-Motiv die bei den anderen SHC konservierten N-terminalen Tyrosin/Leucin-Reste, das QW5b-Motiv fehlt vollständig, beim QW5a fehlt der konservierte Glycin-Rest und beim QW1 fehlen die C-terminalen konservierten Aminosäuren (Q-X₃-G-X-W). Zusätzlich weicht das konservierte aspartatreiche Motiv mit DXDDTTAV von der Konsensussequenz DXDDTAV ab. Die Unterschiede zwischen den SHC-Sequenzen von *Bacillus* und *Alicyclobacillus* entsprechen also den Unterschieden in der 16S rRNA, die zur Abtrennung der *Alicyclobacillus*-Arten von der Gattung *Bacillus* geführt hat (WISOTZKEY *et al.*, 1992).

Das zweite Subcluster umfaßt die SHC der gram-positiven Gattungen *Alicyclobacillus* [01-02] und *Streptomyces* [03-04] sowie die der *Cyanobacteria* [05-10]. Letztere besitzen zwar einen gram-negativen Zellwandaufbau, gehören jedoch nach den neuesten phylogenetischen Untersuchungen auf der Basis von 16S rRNA-Sequenzanalysen eher zu den gram-positiven *Bacteria* (CASTENHOLZ, 2001). Alle SHC dieser Gruppe besitzen das nur hier vorkommende zusätzliche QW5b-Motiv. Während die SHC der *Cyanobacteria* und *Alicyclobacillus* 631-647 AS umfassen, sind die beiden *Streptomyces*-Sequenzen durch zusätzliche AS am N-Terminus mit insgesamt 666 bzw. 680 AS etwas größer.

Außer den Cyclasen der oben genannten Bakterien enthält dieses Subcluster noch eine weitere Sequenz, die aus dem Genom von *Magnaporthe grisea* [32] stammt und die bei einer BLAST-Recherche (ALTSCHUL *et al.*, 1997) mit Hilfe der SHC von *A. acidocaldarius* [01] gefunden wurde. In der GenBank wird die Sequenz bisher noch als „hypothetical protein“ beschrieben. Aufgrund der deutlichen Sequenzhomologie dürfte es sich hier mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine Squalen-Hopen-Cyclase handeln. Da es sich bei *Magnaporthe* ein Vertreter der *Ascomycetes* ist, konnte damit erstmals die Sequenz einer eukaryotischen SHC identifiziert werden. Die großen Übereinstimmungen zwischen der *Magnaporthe*-SHC und den SHC der *Cyanobacteria* und gram-positiven *Bacteria* lassen vermuten, daß *Magnaporthe* das SHC-Gen durch horizontalen Gentransfer von einem Vertreter dieser Bakterien erhalten hat. Für die Bedeutung des horizontalen Gentransfers gerade auch für die Evolution der Gene der Isoprenoid-Biosynthese sind in den letzten Jahren ja einige Anhaltspunkte gefunden worden (BOUCHER & DOOLITTLE, 2000; BOUCHER *et al.*, 2001). Dafür spricht auch, daß die SHC aus *Magnaporthe* das sonst nur

aus *Cyanobacteria*, *Streptomyces* und *Alicyclobacillus* bekannte QW5b-Motiv aufweist. Als phytopathogener Pilz, der die Reis-pflanze befällt, kommt *Magnaporthe* zudem in Biotopen vor, die auch von diesen Bakteriengruppen besiedelt werden. Ein für den Gentransfer notwendiges gemeinsames Vorkommen von Pilz und bakteriellen SHC-Genspender ist deshalb gut vorstellbar. Seit ihrer Übertragung hat diese SHC-Sequenz einige Merkmale erworben, durch die sie sich von den bakteriellen SHC unterscheidet. Dazu gehören drei Insertionen von fünf AS an Position 196, 15 AS an Position 458 sowie neun AS im QW1-Motiv an Position 588 (die Positionsangaben beziehen sich auf die *A. acidocaldarius*-Sequenz; siehe **Anhang**).

Nach dem Ergebnis einer Literaturrecherche ist bisher fast nichts über die Triterpen-Biosynthese in *Magnaporthe* bekannt. Einen entsprechenden Hinweis lieferte demnach lediglich die Klonierung des ERG2-Gens, welches die an der Ergosterol-Biosynthese beteiligte $\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Sterol-Isomerase codiert (KEON *et al.*, 1994). Sollte die SHC in diesem Pilz exprimiert werden, dann wäre *Magnaporthe* nach *Methylococcus capsulatus* erst der zweite bekannte Organismus, in dem Hopan- und Sterol-Biosynthese nebeneinander vorkommen (ROHMER *et al.*, 1980; TAYLOR, 1984). Diese Sterol-Biosynthese könnte durch eine aktive SHC erheblich gestört werden, da die SHC mit der Cyclisierung von Squalen und – bedingt durch ihre relative Substratspezifität – auch von Oxidosqualen der Sterol-Biosynthese gleich zwei Vorläuferverbindungen entziehen würde (siehe **Abbildung 35**), woraus sich interessante Fragen zur Stoffwechselregulation ergeben. *Methylococcus* scheint dieses Problem zumindest teilweise durch eine erhöhte SHC-Substratspezifität gelöst zu haben, denn bei diesem Enzym konnte keine Oxidosqualen-Cyclisierung beobachtet werden (TIPPELT, 1997).

Noch komplizierter wird die Situation in *Magnaporthe* dadurch, daß im Genom zwar die Gene für eine Squalen-Synthase (GenBank Acc. No. EAA55432) sowie Squalen-Monooxygenase (= Squalen-Epoxidase; GenBank Acc. No. EAA53011) vorkommen. Dagegen kann unter den bisher 11.109 bekannten Genen (Release 2.3, Stand 31.10.03; <http://www.broad.mit.edu/annotation/fungi/magnaporthe>) das einer Oxidosqualen-Lanosterol-Cyclase nicht gefunden werden. Alle BLAST-Recherchen der *Magnaporthe*-Datenbank mit der SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* sowie der OSC aus *Saccharomyces cerevisiae* und *Candida albicans* führen ausschließlich zur bekannten SHC-Sequenz [32]. Sollte dies nicht einfach nur an der Unvollständigkeit der bisher bekannten Genomsequenzen liegen, würde dies bedeuten, daß *Magnaporthe* ein Schlüsselenzym der Sterol-Biosynthese fehlt (siehe **Abbildung 35**). Da Hopanoide und Sterole funktionsäqui-

valent sind und z. B. das normalerweise auf Cholesterol angewiesene Bakterium *Mycoplasma mycoides* auch mit Diplopterol als Sterolersatz überleben kann (KANNENBERG & PORALLA, 1982), könnte ein Ausfall der OSC möglicherweise durch eine endogene Hopanoid-Biosynthese kompensiert werden. Alternativ besteht für einen phytopathogenen Organismus sicher auch die Möglichkeit, für den eigenen Bedarf Phytosterole aus den befallenen Wirtszellen aufzunehmen und in den eigenen Stoffwechsel einzuschleusen. Solange die Enzymaktivität der Cyclase aus *Magnaporthe* nicht analysiert ist, kann schließlich auch nicht ausgeschlossen werden, daß die oben genannten Sequenzabweichungen dazu geführt haben, daß aus diesem Enzym eine vollwertige Sterol-Cyclase hervorgegangen ist. Damit hätte sich in diesem Pilz ein Vorgang wiederholt, der in der Evolution der Oxidosqualen-Cyclasen aus Squalen-Cyclasen schon mehrfach stattgefunden hat. Daß ein solches Szenarium weder unmöglich ist, noch eine Vielzahl von Änderungen der betreffenden Cyclase erfordert, zeigt die Tatsache, daß unter einem entsprechenden Selektionsdruck innerhalb von nur wenigen Tagen eine natürlich aufgetretene *Saccharomyces*-Mutante isoliert werden konnte, in der durch einen einzigen AS-Austausch eine Cycloartenol- in eine Lanosterol-Cyclase umgewandelt wurde (HART *et al.*, 1999).

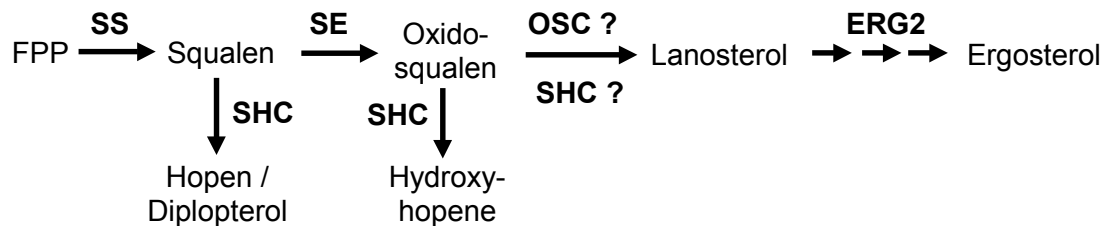


Abbildung 35: Hypothetische Sterol-Biosynthese in *Magnaporthe grisea* 70-15 nach den bisher bei der Genomsequenzierung bekanntgewordenen Genen für Enzyme des Triterpen-Stoffwechsels. Zwei Moleküle Farnesyldiphosphat (FPP) werden von der Squalen-Synthase (SS) zum Squalen kondensiert und durch die Squalen-Epoxidase (SE) zum Oxidosqualen umgesetzt. Dessen Cyclisierung durch eine Oxidosqualen-Sterol-Cyclase (OSC) zum Lanosterol ist bisher ungeklärt, da im Genom von *Magnaporthe* noch kein OSC-Gen gefunden worden. Die weitere Umsetzung von Lanosterol zum Ergosterol geschieht in mehreren Folgereaktionen, die u.a. von ERG2 ($\Delta 8$ - $\Delta 7$ -Sterol-Isomerase) katalysiert werden. SHC: bekannte von der Squalen-Hopen-Cyclase katalysierte Reaktionen. SHC?: hypothetische katalytische Aktivität der SHC in *Magnaporthe* zur Kompensation der möglicherweise fehlenden OSC-Aktivität.

Eine nähere Untersuchung der Funktion dieser Triterpen-Cyclase in *Magnaporthe* (noch SHC oder schon OSC?) und der in diesem Organismus vorkommenden Lipide erscheint deshalb äußerst vielversprechend und könnte zu neuen Erkenntnissen über die Evolution der Triterpen-Cyclasen beitragen.

Das letzte SHC-Subcluster weist die phylogenetisch homogenste Zusammensetzung auf, da alle Sequenzen aus Vertretern der gram-negativen *Proteobacteria* isoliert wurden. Die Anordnung der einzelnen Sequenzen innerhalb des Dendrogramms entspricht dabei wei-

testgehend der aus 16S rRNA-Analysen abgeleiteten systematischen Stellung der jeweiligen Organismen (GARITTY & HOLT, 2001). So sind vier [14-17] der sechs SHC aus Vertretern der *Alphaproteobacteria* auf einem Ast des Dendrogramms zu finden. Die beiden anderen *Alphaproteobacteria*-Sequenzen [20,21] sowie die drei SHC aus Vertretern der *Betaproteobacteria* [18,19,22] und die beiden *Gammaproteobacteria*-Sequenzen [23,24] sind im Dendrogramm dagegen nicht so eindeutig von einander getrennt, wie dies aufgrund ihrer systematischen Zuordnung zu erwarten wäre. Die SHC der *Deltaproteobacteria*, die aus den beiden *Geobacter*-Arten [25,26] stammen, sind dagegen im Dendrogramm wieder auf einem eigenen Ast innerhalb des *Proteobacteria*-Clusters zu finden. Neben der im Alignment verwendeten SHC-Sequenz [26] wurde bei *Geobacter sulfurreducens* noch eine weitere gefunden (GenBank Acc. No. NP_951745), die jedoch deutlich geringere Übereinstimmung mit der SHC von *G. metallireducens* aufweist (nur 40 % Identität bzw. 50 % Ähnlichkeit zu [25] gegenüber > 90 % Übereinstimmung zwischen [25] und [26]) und die deshalb im Dendrogramm nicht mit aufgenommen wurde.

Die SHC-Sequenzen der meisten *Proteobacteria* sind durch zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus mit rund 664 AS im Durchschnitt um ca. 27 AS länger als die der *Cyanobacteria* und der beiden *Alicyclobacillus*-Arten. Nur die SHC der beiden *Geobacter*-Arten sind mit 730 AS deutlich größer und sind damit zugleich die größten bekannten SHC-Sequenzen. Bei ihnen findet man eine 35 AS umfassende Insertion nach Position 300 (wieder bezogen auf die Sequenz von *A. acidocaldarius*) sowie ca. 25 zusätzliche AS am C-Terminus. Bis auf das Fehlen des QW5b-Motivs zeigen die SHC der *Proteobacteria* bei den konservierten Sequenzmotiven sonst keine großen Unterschiede zu den übrigen SHC.

Das Alignment aller bisher bekannten Sequenzen von Squalen-Cyclasen zeigt auch, daß das aspartatreiche Sequenzmotiv dieser Cyclasen um zwei zusätzliche Aminosäuren erweitert werden kann. Die bisherige Sequenz dieses Motives DXDDTAV kann deshalb durch die neue Konsensussequenz YPDXDDTAV ersetzt werden. Der hinzugekommene Prolin-Rest ist bei allen Cyclasen der *Bacteria* sowie der Sequenz aus *Methanosarcina* vorhanden. Auch bei den Cycloartenol-Cyclasen ist diese Aminosäure konserviert, während sie bei den anderen Oxidosqualen-Cyclasen fehlt. Das zusätzliche Tyrosin findet sich in fast allen SHC und fehlt nur in den Cyclasen der *Archaea*, bei *Rhodopirellula* und *Desulfitobacterium* sowie den drei *Bacillus*-Arten. Wie schon erwähnt, weisen letztere bei diesem Motiv ja auch am C-terminalen Ende durch ein zusätzliches Threonin eine weitere Abweichung von der Konsensussequenz auf. Bei den OSC ist das Tyrosin nur bei den

pilzlichen Lanosterol-Cyclasen vorhanden, während bei allen anderen OSC an dieser Position die ebenfalls aromatische Aminosäure Tryptophan vorkommt.

Die dritte und letzte große Gruppe von Sequenzen im Dendrogramm der Triterpen-Cyclasen bilden die zahlreichen Oxidosqualen-Cyclasen. Daß die lange Zeit gültige strikte Aufteilung der Triterpen-Cyclasen in prokaryotische Squalen- und eukaryotische Oxidosqualen-Cyclasen so nicht mehr gültig ist, ist schon mit der geschilderten Entdeckung der ersten eukaryotischen SHC bei *Magnaporthe* deutlich geworden. Neueste Daten zeigen jedoch, daß umgekehrt auch bei verschiedenen Prokaryoten Oxidosqualen-Cyclasen in einem größeren Ausmaß vorhanden sind, als dies bisher angenommen wurde. So ging man bisher davon aus, daß nur *Methylococcus capsulatus*, *Nannocystis exedens* und *Polyangium* sp. unter den Prokaryoten zu einer Sterolbiosynthese fähig sind (BODE *et al.*, 2003). Allerdings war es bisher nicht gelungen, das Gen einer bakteriellen Oxidosqualen-Cyclase zu isolieren (TIPPELT *et al.*, 1998). Dies gelang nun erstmals mit der erfolgreichen Klonierung einer Cycloartenol-Cyclase aus dem Myxobakterium *Stigmatella aurantiaca* [46]. Zusätzlich konnten bei weiteren Myxobakterien ebenfalls cyclisierte Oxidosqualenderivate identifiziert werden. Dazu gehören Lanosterol bei *Cystobacter minor* und *Polyangium* sp. sowie Cycloartenol bei *Cystobacter violaceus*. Die Klonierung weiterer OSC ist in Arbeit, jedoch liegen bisher dazu noch keine Ergebnisse vor (BODE *et al.*, 2003).

In einer weiteren Arbeit wurde kürzlich über den Nachweis von OSC-Gensequenzen im Genom von *Methylococcus capsulatus* und *Gemmata obscuriglobus* berichtet (PEARSON *et al.*, 2003). Bei beiden Arten ist die von TIGR durchgeführte Genomsequenzierung noch nicht abgeschlossen. Da deshalb die AS-Sequenzen dieser potentiellen Lanosterol-Cyclasen bisher weder in der GenBank verfügbar sind, noch in der Publikation angegeben wurden, wurde dafür eine BLAST-Recherche (Proteinsequenz gegen translatierte DNA-Sequenz) der TIGR-Datenbank (<http://www.tigr.org>) durchgeführt. Verwendet wurden dafür die OSC-Sequenzen von *Homo sapiens* [45], *Mus musculus* [43], *Rattus norvegicus* [44] und *Oryza sativa* [52], die nach PEARSON *et al.* die besten Ergebnisse geliefert haben. Die mit diesen vier Sequenzen jeweils bei *Methylococcus capsulatus* und *Gemmata obscuriglobus* identifizierbaren homologen Sequenzen unterschieden sich in ihrer Länge jeweils um einige Aminosäuren. Durch ein Alignment konnten sie jedoch zu jeweils einer Sequenz von insgesamt 642 AS zusammengesetzt werden. Damit sind die so erhaltenen OSC-Sequenzen bei *Gemmata obscuriglobus* [33] um sieben AS und bei *Methylococcus capsulatus* [34] um 28 AS kürzer, als die von PEARSON *et al.* beschriebenen entsprechenden Sequenzen. Es wurde trotzdem darauf verzichtet, bei TIGR die bisher bekannten Genomse-

quenzen dieser beiden Arten anzufordern, um durch deren Analyse die noch fehlenden Aminosäuren zu ermitteln. Wie aus dem Alignment hervorgeht, dürften die fehlenden AS den N-Terminus und damit einen nur wenig konservierten Sequenzabschnitt vor dem QW6-Motiv betreffen. Dafür spricht auch, daß die Längendifferenz bei *G. obscuriglobus* geringer ausfällt – da PEARSON *et al.* direkt vor dem OSC-Gen das einer Squalen-Epoxidase (SE) gefunden haben, fehlt hier der Platz für zahlreiche zusätzliche AS. Im Gegensatz dazu wurde bei *Methylococcus capsulatus* eine gerade umgekehrte Genreihenfolge (erst OSC, dann SE) gefunden, wodurch eine N-terminale Sequenzverlängerung der OSC nicht behindert wird.

Wie schon erwähnt, erscheint es fraglich, ob auch bei *Rhodopirellula baltica* eine Cycloartenol-Cyclase vorkommt, da diese Sequenz keine große Ähnlichkeit zu den anderen bekannten Oxidosqualen-Cyclasen aufweist und bei der es sich wahrscheinlich um eine weitere SHC handelt. Eindeutig läßt sich dies jedoch erst sagen, wenn diese Cyclase *in vitro* genauer analysiert werden kann.

Bei den beiden bei *Methylococcus capsulatus* und *Gemmata obscuriglobus* gefundenen Sequenzen handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um Oxidosqualen-Lanosterol-Cyclasen. So sind Lanosterol und dessen Demethylierungsderivate bei *Methylococcus capsulatus* gefunden worden (BIRD *et al.*, 1971; BOUVIER *et al.*, 1976) und bei *Gemmata* konnten Lanosterol und dessen Isomer Parkeol als Membranlipide nachgewiesen werden (PEARSON *et al.*, 2003). Schließlich findet man im Dendrogramm der Triterpen-Cyclasen diese beiden Sequenzen an der Basis des OSC-Clusters, wo auch die anderen Lanosterol-Cyclasen zu finden sind. Dabei zeigen die einzelnen Sequenzen im Dendrogramm eine mit der Phylogenie der Organismen übereinstimmende Clusterung. Auf die Sequenzen der beiden Bakterien folgen die der Protozoen [35,36], dann die der Pilze und Hefen [37-42] und als letztes die der Säugetiere [43-45]. Während die bakteriellen OSC mit 642 AS noch den bakteriellen SHC entsprechen, sind alle OSC der Eukaryoten im Durchschnitt um rund 100 AS größer. Lediglich die beiden Cyclasen aus *Trypanosoma* sind durch zusätzliche AS am N-Terminus mit 858 bzw. 905 AS erheblich größer und werden von keiner anderen bisher bekannten Triterpen-Cyclase übertroffen.

Auch bei den Oxidosqualen-Cycloartenol-Cyclasen findet man eine entsprechende Anordnung im Dendrogramm: an der Basis des Clusters die bakterielle Cyclase aus *Stigmatella aurantiaca* [46], dann das Enzym aus dem zellulären Schleimpilz *Dictyostelium* [47] und dann alle pflanzlichen Enzyme [48-59]. Bei letzteren können im Dendrogramm die Cyclo-

artenol-Cyclasen der Gymnospermen [48], der monocotylen Angiospermen [49-52] und der dicotylen Angiospermen deutlich von einander unterschieden werden.

Alle weiteren Oxidosqualen-Cyclasen sind bisher ausschließlich aus Angiospermen isoliert worden und scheinen sich nach ihrer Abzweigung im Dendrogramm aus Cycloartenol-Cyclasen entwickelt zu haben (ZHANG *et al.*, 2003). Deutlich kann dabei die Gruppe der Lupeol-Cyclasen [60-63] erkannt werden. Eine weitere Lupeol-Cyclase aus *Arabidopsis* [64] befindet sich dagegen im Cluster der β -Amyrin-Cyclasen [65-72]. Im Gegensatz zu den anderen Cyclasen handelt es sich hier häufig um multifunktionelle Cyclasen, von denen mehrere Cyclisierungsprodukte bekannt sind. Bei ihnen wird vermutet, daß es sich um Übergangsstadien in der Evolution von einer monofunktionellen hin zu einer anderen monofunktionellen Cyclase mit verändertem Produktspektrum handelt (ZHANG *et al.*, 2003). Zwei Beispiele für derartige neue Cyclasen stellen z. B. die α -Amyrin-Cyclase aus *Pisum sativum* [73] und die Isomultiflorenol-Cyclase aus *Luffa cylindrica* [74] dar, die ebenfalls im Dendrogramm im Cluster der β -Amyrin-Cyclasen zu finden sind.

Aufgrund der äquivalenten Funktion von Hopanoiden und Sterolen sowie der ähnlichen Cyclisierungsreaktion wurde schon lange vermutet, daß die Oxidosqualen-Cyclasen aus Squalen-Cyclasen hervorgegangen sind (ROHMER *et al.*, 1979). Die Verwandtschaft dieser Enzyme wurde durch die Entdeckung konservierter Sequenzmotive in beiden Enzymgruppen eindrucksvoll bestätigt (PORALLA *et al.*, 1994; ABE & PRESTWICH, 1999).

Die ubiquitäre Verbreitung der Sterol-Biosynthese bei den *Eukarya* und deren fast vollständiges Fehlen bei Prokaryoten wurde bisher so interpretiert, daß in der Evolution diese Fähigkeit erst innerhalb der *Eukarya* entstanden ist und hier zu einem für diese Gruppe kennzeichnenden Merkmal geworden ist. Bei den wenigen Ausnahmen unter den Prokaryoten wurde deshalb vermutet, daß sie diese Fähigkeit zur Sterolproduktion durch einen horizontalen Gentransfer von den *Eukarya* erhalten haben (KNOLL, 2003). Die nun vorhandenen Sequenzen einer Cycloartenol-Cyclase aus *Stigmatella aurantiaca* und den Lanosterol-Cyclasen aus *Methylococcus capsulatus* und *Gemmata obscuriglobus* scheinen dieser Theorie jedoch zu widersprechen. So zeigen die neuen Daten, daß die Sterolbiosynthese bei Prokaryoten wesentlich verbreiteter ist, als ursprünglich angenommen wurde. Zudem sind die Oxidosqualen-Cyclasen in verschiedenen Gruppen der *Bacteria* gefunden worden, die zum Teil nicht miteinander verwandt sind (siehe **Tabelle 11**). Sollten die *Bacteria* die Fähigkeit zur Sterolbiosynthese durch horizontalen Gentransfer von den *Eukarya* erhalten haben, müßte ein solches Ereignis mehrfach in der Evolution stattgefunden haben, um die beobachtete Verbreitung in Prokaryoten erklären zu können. Zusätzlich wird

ein Gentransfer von *Eukarya* zu Prokaryoten (im Gegensatz zu einem Gentransfer in umgekehrter Richtung, für den es zahlreiche Beispiele gibt) als eher unwahrscheinlich angesehen (PEARSON *et al.*, 2003). Gegen einen Gentransfer sprechen auch die Positionen der bakteriellen Oxidosqualen-Cyclasen im Dendrogramm der Triterpen-Cyclasen (siehe **Abbildung 34**). So sind die beiden Lanosterol-Cyclasen aus *Methylococcus* und *Gemmata* zwar im Cluster bei den eukaryotischen Lanosterol-Cyclasen zu finden, doch sind sie zugleich deutlich von diesen abgesetzt. Das gleiche kann auch bei der Cyclase aus *Stigmatella* und den anderen eukaryotischen Cycloartenol-Cyclasen beobachtet werden. Bei einer Abstammung der prokaryotischen von eukaryotischen Cyclasen durch Gentransfer sollten diese dagegen im Dendrogramm auch in deren Nähe zu finden sein, wie dies in entsprechender Weise z. B. bei der SHC von *Magnaporthe* im Cluster der *Cyanobacteria* und der gram-positiven *Bacteria* der Fall ist.

Tabelle 11: Bisher bekannte Verbreitung der aus Oxidosqualen gebildeten Sterole und deren biochemische Variabilität bei Pro- und Eukaryoten (nach BODE *et al.*, 2003 und PEARSON *et al.*, 2003)

C ₃₀ -Sterole	C ₂₉ -Sterole	C ₂₈ -Sterole	C ₂₇ -Sterole	Organismus	Taxon
Lanosterol Parkeol	-	-	-	<i>Gemmata</i>	<i>Planctomycetales</i>
Lanosterol	+	+	-	<i>Methylococcus capsulatus</i>	<i>Methylococcales</i>
Cycloartenol	-	-	-	<i>Stigmatella aurantiaca</i>	<i>Myxobacterales</i>
Lanosterol	+	+	+	<i>Nannocystis exedens</i>	<i>Myxobacterales</i>
Cycloartenol	+			Pflanzen	<i>Eukarya</i>
Lanosterol	+	+		Pilze	<i>Eukarya</i>
Lanosterol	+	+	+	Tiere	<i>Eukarya</i>

Ein Vorkommen der Sterolbiosynthese schon beim letzten gemeinsamen Vorfahren der *Bacteria* und *Eukarya* (sowie der *Archaea*, obwohl hier bisher keine Hinweise für Oxidosqualen-Cyclasen vorliegen) erscheint ebenfalls eher unwahrscheinlich. Eine solche Annahme müßte nämlich auch erklären können, warum dann die meisten Prokaryoten die Fähigkeit zur Sterolbiosynthese sekundär wieder verloren haben und diese nur bei den wenigen heute bekannten Vertretern erhalten blieb (PEARSON *et al.*, 2003).

Aus diesen Gründen kann eine Entstehung der Sterolbiosynthese in Prokaryoten angenommen werden. Die Verbreitung innerhalb der *Bacteria* deutet zudem daraufhin, daß dies mehrfach unabhängig geschehen ist. Aufgrund der Sequenzhomologien mit den anderen bekannten Triterpen-Cyclasen geht eindeutig hervor, daß die Vorfahren der bakteriellen Oxidosqualen-Cyclasen bei den Squalen-Cyclasen zu finden sind. Ein Vergleich der Sequenzen dieser Cyclasen zeigt, daß die drei bisher bekannten bakteriellen Oxidosqualen-Cyclasen ein Mosaik von Merkmalen der prokaryotischen SHC sowie der eukaryotischen OSC aufweisen. So sind alle drei Cyclasen deutlich kürzer als die entsprechenden eukaryotischen Enzyme und entsprechen damit eher den SHC mit ihren durchschnittlich 644 AS (Sequenzen [01]-[32]). Die beiden Lanosterol-Cyclasen aus *Methylococcus* und *Gemmata* sind mit 642 Aminosäuren (bzw. 670 und 649 AS nach PEARSON *et al.*) rund 60 bis 100 AS kürzer als die eukaryotischen Lanosterol-Cyclasen und die Cyclase aus *Stigmatella* ist mit ihren 597 AS sogar um ca. 100 bis 150 AS kürzer als die entsprechenden eukaryotischen Cycloartenol-Cyclasen. Andererseits weisen sie deutliche Übereinstimmungen ihrer Sequenzen mit den anderen Oxidosqualen-Cyclasen auf und unterscheiden sich hierin deutlich von den bakteriellen SHC. Keine der drei Cyclasen besitzt z. B. das aspartatreiche Sequenzmotiv mit der prokaryotischen Konsensussequenz YPDXDDTAV. Bei *Stigmatella* entspricht die Sequenz mit GWPISDCTAE der der anderen Cycloartenol-Cyclasen. Auch die beiden bakteriellen Lanosterol-Cyclasen zeigen hier deutliche Übereinstimmungen zu den anderen Lanosterol-Cyclasen, auch wenn dieses Motiv in dieser Gruppe nicht so deutlich konserviert ist, wie bei den Cycloartenol-Cyclasen. Daneben zeigen die drei bakteriellen OSC auch mehr Sequenzübereinstimmungen mit den eukaryotischen OSC bei den QW-Motiven und anderer konservierten AS als mit den anderen bakteriellen Cyclasen. Generell kann bei den in **Abbildung 34** gezeigten Triterpen-Cyclasen ein Trend zu immer größeren Proteinen beobachtet werden, der mit der Position der jeweiligen Cyclasen im Dendrogramm übereinstimmt. Während die Hopan-Cyclasen im Durchschnitt nur 644 Aminosäuren umfassen, findet man bei den Lanosterol-Cyclasen durchschnittlich 718 (bei Berücksichtigung der ungewöhnlich großen *Trypanosoma*-Cyclasen sogar 743), bei den Cycloartenol-Cyclasen 732, bei den Lupeol-Cyclasen 754, bei den β -Amyrin-Cyclasen und der Isomultiflorenol-Cyclase 759 und schließlich bei der α -Amyrin-Cyclase 764 Aminosäuren. Allerdings kann diese Größenzunahme alleine keine Voraussetzung für die Funktion dieser Oxidosqualen-Cyclasen sein, da die drei entsprechenden bakteriellen Enzyme wesentlich kleiner sind und trotzdem die gleichen Reaktionen katalysieren.

Neben dieser Größenzunahmen hat die Evolution der Triterpen-Cyclasen auch zu einer veränderten Substratspezifität sowie zu Änderungen in der Proteinstruktur dieser Cyclasen geführt, die für eine veränderte Substratfaltung im aktiven Zentrum, eine veränderte Cyclisierungsreaktion und damit auch für ein verändertes Produktspektrum verantwortlich sind. Bei den ursprünglichen Squalen-Cyclasen verläuft die Cyclisierung über das 17-Isodammarenyl-Kation, das eine Sessel-Sessel-Sessel- mit einer $17\beta(\text{H})$ -Konformation aufweist (HOSHINO & SATO, 2002). Bei den Lanosterol- und Cycloartenol-Cyclasen verläuft die Cyclisierung dagegen über das Protosteryl-Kation mit einer Sessel-Boot-Sessel-Konformation (ABE & PRESTWICH, 1999, PORALLA, 1999). Durch eine andere Orientierung der Seitenkette unterscheidet sich das Protosteryl-Kation zusätzlich durch seine $17\alpha(\text{H})$ -Konformation vom 17-Isodammarenyl-Kation der SHC (siehe **Abbildung 36**). Bei den von Cycloartenol-Cyclasen abgeleiteten Lupeol-, Amyrin- und Isomultiflorenol-Cyclasen behält das intermediäre Dammarenyl-Kation zwar die $17\alpha(\text{H})$ -Konformation, jedoch weisen die ersten drei Cyclen nun wie beim Hopan wieder eine Sessel-Sessel-Sessel-Konformation auf (ZHANG *et al.*, 2003).

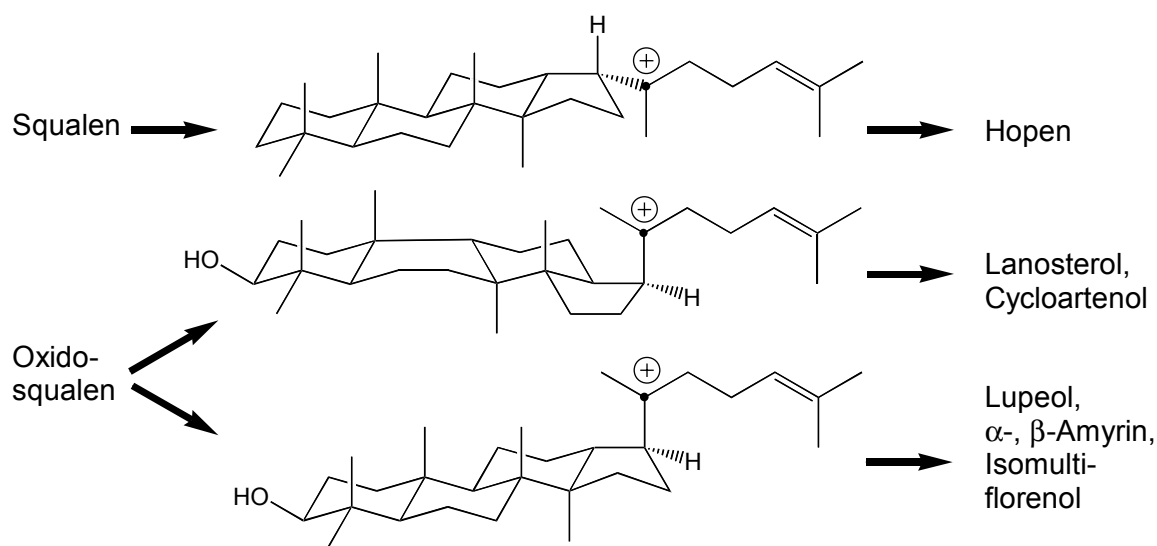


Abbildung 36: Struktur der intermediären C-18⁺-Carbokationen bei der Cyclisierungsreaktion der verschiedenen Triterpen-Cyclasen: 17-Isodammarenyl-Kation (Squalen-Hopen-Cyclasen), **Protosteryl-Kation** (Oxidosqualen-Lanosterol- und Cycloartenol-Cyclasen) und **Dammarenyl-Kation** (Oxidosqualen-Lupeol-, Amyrin- und Isomultiflorenol-Cyclasen). Die intermediären Carbokationen unterscheiden sich deutlich in der Ring-Konformation und der Konformation der Seitenkette am C-17.

Aus der Anordnung der verschiedenen Triterpen-Cyclasen in **Abbildung 34** kann für die einzelnen der oben genannten evolutionären Veränderungen folgende Reihenfolge angenommen werden:

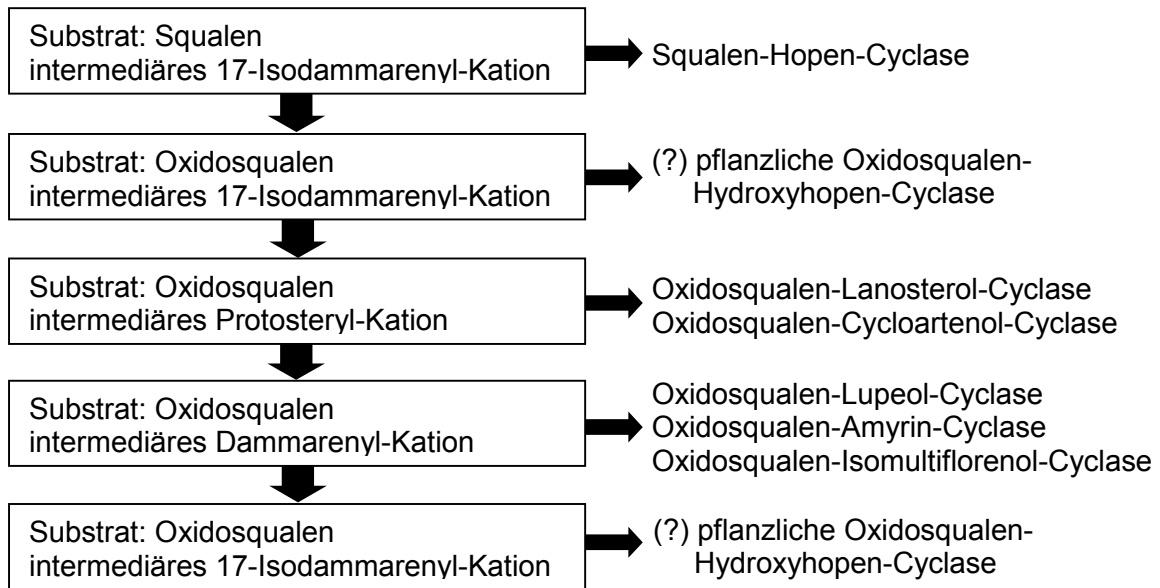


Abbildung 37: Reihenfolge der Veränderungen in der Evolution der Triterpen-Cyclasen, wie sie aus dem Dendrogramm der AS-Sequenzen dieser Enzyme (Abbildung 34) abgeleitet werden kann. Da bisher noch keine Sequenz einer pflanzlichen Hydroxyhopen-Cyclase bekannt ist, kann deren Position in dieser Reihenfolge noch nicht bestimmt werden (siehe Text).

Offen ist zur Zeit noch, welche Sequenzänderungen im einzelnen in den verschiedenen Cyclasen für die unterschiedliche Substratspezifität und die unterschiedliche Substratfaltung im aktiven Zentrum verantwortlich sind. Kürzlich wurde über die Analyse der menschlichen Lanosterol-Cyclase durch "homology modeling" mit der dreidimensionalen Struktur der SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* als Template berichtet. Die unterschiedliche Faltung des Substrats, die zur Sessel-Konformation des B-Rings bei der Hopen-Cyclase und zur Boot-Konformation bei der Lanosterol-Cyclase führt, soll demnach auf Änderungen in zwei im aktiven Zentrum gegenüberliegenden Sequenzmotiven in der Nähe des C-8⁺-Carbokations zurückzuführen sein. Demnach führt bei der menschlichen OSC die Insertion einer Aminosäure mit großer Seitenkette zu einer Verengung einer Seite des aktiven Zentrums, während auf der gegenüberliegenden Seite durch die Deletion einer Aminosäure mehr Platz geschaffen wird. In den nachfolgenden Sequenzabschnitten sind die entsprechenden Positionen durch graue Balken hervorgehoben:

<i>A. acidocaldarius</i>	SHC:	G ₂₅₉ -GI . . . G ₅₉₈ TGF
<i>Homo sapiens</i>	OSC:	T ₃₃₀ KSI . . . G ₆₉₄ V-F

Die sterische Behinderung des C-8⁺-Carbokations durch die positiv geladene Seitenkette des Lys331 soll bei der OSC die Ausbildung einer Sessel-Konformation verhindern und die Faltung zur energetisch weniger begünstigten Boot-Konformation bewirken (SCHULZ-GASCH & STAHL, 2003). Allerdings kann diese Aminosäure nicht alleine für die

unterschiedliche Konformation des B-Rings bei SHC und OSC verantwortlich sein. Wie das Alignment aller Triterpen-Cyclasen (siehe **Anhang**) zeigt, sind derartige Sequenzänderungen nämlich auch bei den OSC vorhanden, bei denen die Cyclisierung nicht über das Protosteryl-Kation verläuft. So ist bei allen Amyrin-, Lupeol- und Isomultiflorenol-Cyclasen eine Aminosäure mit positiv geladener Seitenkette (hier jedoch in der Regel ein Arginin) im ersten Motiv vorhanden. Da die dritte Aminosäure dieses Motives immer ein Tyrosin ist, sollte durch diese zusätzliche große Seitenkette der B-Ring noch verstärkt in die Boot-Konformation gepreßt werden und trotzdem weisen die Cyclisierungsprodukte dieser Enzyme eine Sessel-Konformation des B-Rings auf. Da die Sequenz der Cyclase aus *Magnaporthe grisea* bei den beiden oben genannten Motiven mit den anderen SHC übereinstimmt und nicht die OSC-Sequenz aufweist, liefert das Modell von SCHULZ-GASCH & STAHL keinen Hinweis, ob die durch Gentransfer erworbene bakterielle SHC in diesem Pilz inzwischen die Funktionalität einer Lanosterol-Cyclase erworben hat. Unter Berücksichtigung der oben genannten Einschränkungen weist die Arbeit von SCHULZ-GASCH & STAHL jedoch darauf hin, daß so ausgeprägte Unterschiede in der Konformation der Produkte mit der Änderungen weniger Aminosäuren des aktiven Zentrums des Enzyms erreicht werden können.

Hilfreich für das Verständnis der Evolution der Triterpen-Cyclasen wäre auch die Kenntnis über die Position der pflanzlichen Oxidosqualen-3-Hydroxyhopen-Cyclasen im Dendrogramm, von denen bisher jedoch noch keine Aminosäuresequenz bekannt ist. Eine mögliche Position wäre zwischen den SHC und den Lanosterol-/Cycloartenol-Cyclasen. Dies würde bedeuten, daß es sich bei ihnen um die ursprünglichsten Oxidosqualen-Cyclasen handelt, die sich lediglich durch eine geänderte Substratspezifität von den SHC unterscheiden. Weitere Änderungen des aktiven Zentrums sind jedoch nicht notwendig, da in beiden Fällen die Cyclisierung über das 17-Isodammarenyl-Kation verläuft. Bei der Zahl der Aminosäuren sollten diese Enzyme eher den SHC entsprechen und deutlich kleiner als die anderen Oxidosqualen-Cyclasen sein. Durch einen Sequenzvergleich mit den SHC könnten deshalb vielleicht die Aminosäuren des aktiven Zentrums identifiziert werden, die einen Einfluß auf die Substratspezifität haben. Andererseits wäre es auch möglich, daß diese Cyclasen im Dendrogramm im Cluster der Lupeol-, Amyrin- und Isomultiflorenol-Cyclasen zu finden wären, da auch bei diesen Cyclasen die Cyclisierung über ein intermediäres C-18⁺-Carbokation mit einer Sessel-Sessel-Sessel-Konformation verläuft. Da es sich bei den Hydroxyhopen-Cyclasen jedoch nicht um das Dammarenyl-Kation, sondern um das 17-Isodammarenyl-Kation handelt, muß für die Evolution dieser Cyclasen

eine zusätzliche Veränderung des aktiven Zentrum gefordert werden, die zu einer geänderten Substratfaltung und damit zu einem Produkt mit einer veränderten Orientierung der Seitenkette führt, die jetzt eine 17 β (H)-Konformation aufweist. In diesem Fall wären die Hydroxyhopen-Cyclasen die am stärksten abgeleiteten Oxidosqualen-Cyclasen, die – ursprünglich von einer SHC mit intermediärem 17-Isodammarenyl-Kation ausgehend – über Cyclasen mit intermediären Protosteryl- und Dammarenyl-Kation nun wieder bei einer Cyclase mit einem intermediärem 17-Isodammarenyl-Kation angekommen sind. Bei einer solchen Position im Dendrogramm der Triterpen-Cyclasen sollten die Hydroxyhopen-Cyclasen nicht nur wesentlich größer als die Squalen-Hopen-Cyclasen sein, sondern wahrscheinlich auch größer als alle anderen bisher bekannten pflanzlichen Cyclasen sein.

Offen bleibt, warum in den Prokaryoten die Mutationen in Squalen-Cyclasen, die zu den oben geschilderten Veränderungen führten, erhalten blieben und sich so im Laufe der Zeit die verschiedenen Oxidosqualen-Cyclasen herausbilden konnten. Zwar wird diskutiert, daß die Produkte der OSC für die jeweiligen Organismen vorteilhafte Funktionen übernehmen konnten, für die die Hopanoide nicht geeignet waren (PEARSON *et al.*, 2003). Bei *Stigmatella* konnte jedoch bei Ausschaltung der Cycloartenol-Biosynthese durch Mutagenese keine erkennbaren Auswirkungen auf das Wachstum dieser Bakterien festgestellt werden (BODE *et al.*, 2003), sodaß weitere Forschungsarbeiten zur Klärung dieser Frage notwendig sind.

Bei den bisher nur aus Angiospermen bekannten Lupeol-, Amyrin- und Isomultiflorenol-Cyclasen kann angenommen werden, daß sie parallel zur Evolution der entsprechenden Pflanzen im späten Mesozoikum – in Anfängen eventuell bis ins späte Paläozoikum zurückreichend (WILLIS & MCELWAIN, 2002) – entstanden sind. Alle anderen Triterpen-Cyclasen müssen dagegen schon viel früher existiert haben, wie Nachweise der entsprechenden cyclischen Triterpene in präkambrischen Ablagerungen zeigen. Squalen-Hopen-Cyclasen müssen demnach schon vor mehr als 2,7 bis 2,5 Mrd. Jahre existiert haben, da 2-Methylhopanoide in entsprechend alten westaustralischen Ablagerungen nachgewiesen wurden (BROCKS *et al.*, 1999). Da *Cyanobacteria* zur Zeit die einzige bekannte Organismengruppe sind, in der 2-Methylhopanoide in größerem Umfang vorkommen (ROHMER *et al.*, 1984), ist dies zugleich ein Hinweis, daß diese Prokaryoten mit ihrer oxigenen Photosynthese schon zu diesem Zeitpunkt existiert haben (SUMMONS *et al.*, 1999). Funde von 3,5 Mrd. Jahre alten Stromatolithen mit entsprechenden Mikrofossilien sowie ¹²C/¹³C-Isotopenuntersuchungen deuten zwar darauf hin, daß cyanobakterienähnliche photosynthe-

tische Mikroorganismen schon früher existiert haben (SCHOPF, 1993, 1999, 2002). Da eine derartige Interpretation jedoch nicht unumstritten ist und für diese Funde auch eine abiotische Entstehung verantwortlich gemacht wird (BRASIER *et al.*, 2002), bieten die gefundenen Hopanoide dafür die zur Zeit am weitesten zurückreichenden eindeutigen Hinweise. Die ältesten Vorkommen cyclischer Oxidosqualen-Derivate stammen ebenfalls aus 2,7 bis 2,6 Mrd. Jahre alten Gesteinen (BROCKS *et al.*, 1999). Zwar kann nach dem Nachweis bakterieller Oxidosqualen-Cyclasen dies nicht mehr uneingeschränkt als Hinweis für fossile *Eukarya* interpretiert werden. Da jedoch die bisher bekannten bakteriellen Sterol-Biosynthesewege nur bis zu C₂₇-Verbindungen führen (siehe **Tabelle 11**) und Modifikationen am C-24 ausschließlich von *Eukarya* bekannt sind, deuten entsprechende Funde fossiler Biomarker darauf hin, daß die ersten Eukaryoten mindestens 0,5 bis 1 Mrd. Jahre früher existiert haben, als dies bisher durch die ältesten bekannten Fossilfunde belegt ist (KNOLL, 2003).

4.3 Oligomerisierung der SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius*

Das Molekulargewicht der SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* beträgt nach der von der korrigierten Gensequenz ableitbaren Aminosäuresequenz 71,5 kDa (siehe **3.1.2**). Ein vergleichbares Molekulargewicht liefert auch die SDS-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen. Unter nichtdenaturierenden Bedingungen wurde dagegen von NEUMANN & SIMON (1986) durch Gelfiltrationschromatographie in Gegenwart des Detergenz Polidocanol ein Molekulargewicht der SHC von 150 kDa ermittelt, was auf ein Vorliegen der Cyclase als Dimer hindeutet. Vergleichbare Werte wurden auch mit den Detergenzien Triton X-100 von TAPPE (1993) und mit n-Octyl-Tetraoxyethylen (C₈E₄) von WENDT (1997) ermittelt. Zusätzliche Hinweise für die Dimerisierung der SHC lieferten auch die für die Röntgenstrukturanalyse verwendeten Kristallstrukturen (WENDT, 1997; WENDT *et al.*, 1999). Sowohl von NEUMANN & SIMON als auch von WENDT wurde die Beobachtung gemacht, daß eine Reduzierung der Detergenzkonzentration bei der Analyse zu einer Verschiebung des Molekulargewichts der SHC zu deutlich höheren Werten führt. Wurde überhaupt kein Detergenz verwendet, dann lag die SHC demnach als multimerer Komplex mit einem MW von > 600 kDa vor (NEUMANN & SIMON, 1986). Da die beobachteten Kontaktflächen des SHC-Dimers wesentlich polarer sind, als dies sonst bei oligomeren Proteinen der Fall ist, wurde vermutet, daß die Dimerisierung der SHC wohl nur vorübergehender Natur ist und in einem Gleichgewicht mit größeren Oligomerenkomplexen steht (WENDT, 1997; WENDT *et al.*, 1999).

Bei der Proteinreinigung im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten größere Mengen vollständig detergentzfreier SHC gewonnen werden (siehe 3.3.2). Damit wurden die Versuche zur Molekulargewichtsbestimmung unter nichtdenaturierenden Bedingungen wiederholt, um Hinweise auf eine Oligomerisierung der SHC unter nativen Bedingungen zu erhalten. Dadurch sollte auch ausgeschlossen werden, daß bei den bisherigen Experimenten ein höheres Molekulargewicht durch die Bindung zahlreicher Detergenzmoleküle an die SHC nur vorgetäuscht wurde. So wurde z. B. das gemessene Molekulargewicht von 150 kDa von TAPPE (1993) nicht auf einen SHC-Dimer, sondern auf einen stabilen Komplex aus einem SHC-Molekül in einer Triton X-100-Micelle zurückgeführt.

Die Molekulargewichtsbestimmung mit detergentzfreier SHC wurde mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie sowie durch FPLC-Analyse durchgeführt (siehe 3.6.1 & 3.6.2). Mit einem ermittelten Molekulargewicht von 442 kDa bei der Gelfiltrationschromatographie bzw. von 453 kDa bei der FPLC-Analyse sind die ermittelten Werte zu groß für ein SHC-Dimer und entsprechen eher einem SHC-Hexamer. In mehreren Läufen konnte zudem die Komplexbildung der SHC mit den im selben Lauf eingesetzten Markerproteinen beobachtet werden, die dann alle zusammen in einem einzigen Peak von der Säule eluierten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die SHC ohne hydrophobe Umgebung durch Membranlipide und ohne ersatzweise Stabilisierung durch Detergenzien dazu neigt, mit anderen SHC-Molekülen bzw. mit anderen Proteinen größere Komplexe zu bilden. Dafür dürfte das hydrophobe Areal auf der Moleküloberfläche verantwortlich sein, mit der die SHC normalerweise als membranassoziiertes Protein in die Cytoplasmamembran eintaucht. Eine solche Komplexbildung ist dadurch begünstigt, daß auf diese Weise in wässriger Lösung die Kontaktflächen zwischen hydrophober Moleküloberfläche und hydrophiler Umgebung minimiert werden können.

Die Vermutung, daß die SHC als Dimer vorliegt, kann also durch die hier erzielten Ergebnisse mit detergentzfreier Cyclase nicht bestätigt werden. Dagegen stehen die Ergebnisse in Einklang mit den Beobachtungen von NEUMANN & SIMON und WENDT, daß die postulierte Dimerbildung der SHC in detergentzhaltigen Lösungen durch Proteinkomplexe mit höherem Molekulargewicht ersetzt wird, wenn die Detergenzkonzentration gegen Null geht.

Offen bleibt damit, ob bei einer solch instabilen Dimerisierung diese überhaupt von Bedeutung für die Enzymaktivität sein kann. Ähnliches gilt offenbar auch für die eukaryotischen Oxidosqualen-Cyclasen. Zwar liefert die nichtdenaturierende Gelelektrophorese auch hier Hinweise auf eine Dimerisierung (WU *et al.*, 2004), doch konnte zumindest bei

der humanen OSC inzwischen nachgewiesen werden, daß dieses Enzym als Monomer aktiv ist (RUF *et al.*, 2004).

Ein sicherer Nachweis einer Dimerisierung der SHC von *Alicyclobacillus* wäre möglich, wenn es gelänge, die beiden Monomere durch Crosslinker miteinander zu vernetzen. Im SDS-PAGE sollte dann eindeutig ein Molekulargewicht von ca. 140 kDa nachweisbar sein. Von WENDT *et al.* (2000) wurde auch vorgeschlagen, die Aminosäuren der Dimerkontaktfläche durch Mutagenese zu verändern und mögliche Auswirkungen auf Enzymaktivität und Membranbindung zu analysieren.

4.4 Deletionsmutagenese der SHC

Zu Beginn dieser Arbeit war die dreidimensionale Struktur der SHC aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* noch nicht bekannt. Hinweise auf potentielle Aminosäuren des aktiven Zentrums der Cyclase lieferten nur die konservierten QW-Sequenzmotive, deren Funktionsaufklärung durch Mutageneseexperimente in Bearbeitung war (FEIL, 1997). Da ein Sequenzalignment der zu diesem Zeitpunkt bekannten Hopan-Cyclasen inklusiv der QW-Motive über 100 konservierte Aminosäuren aufwies, sollte durch die Konstruktion von Deletionsmutanten und der Analyse ihrer Auswirkungen auf die Enzymaktivität versucht werden, die Zahl der für die Funktionalität der SHC entscheidenden Aminosäuren einzuschränken und gleichzeitig die für die Aktivität notwendige minimale Proteingröße zu bestimmen. Das längst nicht alle Aminosäuren für die Enzymaktivität notwendig sind, konnte z.B. an einem anderen Enzym des bakteriellen Triterpen-Stoffwechsels, der Squalen-Synthase aus *Methylococcus capsulatus*, gezeigt werden, wo durch N- und C-terminale Deletionen ohne Verlust der Enzymaktivität fast ein Viertel aller Aminosäuren deletiert werden konnte (TIPPELT, 1997).

Da die Zahl der im Protein vorkommenden QW-Motive mit der Zahl der bei der Squalen-Cyclisierung gebildeten Cyclen in Verbindung gebracht worden war (PORALLA, 1994), sollte durch die Deletion von QW-Motiven auch herausgefunden werden, ob dies zu einer Veränderung der Zahl der Cyclen im Produkt dieser mutierten Cyclasen führt. Für die Erzeugung der N- und C-terminalen Deletionsmutanten wurde das von FEIL konstruierte pCyc-Plasmid mit einem N-terminalen His₆-tag verwendet, das Protokoll der Proteinreinigung durch Metallaffinitätschromatographie wurde ebenfalls übernommen (FEIL, 1997). Bei der Mutagenese konnte eine erfolgreiche Bindung der Mutageneseprimern an die Ziel-DNA erzielt werden, wenn diese beiderseits des die Deletion verursachenden mismatch eine Sequenzübereinstimmung von ca. 15 Nukleotiden aufwiesen.

4.4.1 N-terminale Deletionen

Die **DelN1-Mutante** wurde durch Deletion der ersten sechs N-terminalen Aminosäuren A2 bis E7 erzeugt. Die Aktivität dieser Cyclase zeigte im Vergleich zum Wildtyp im Enzymtest zu Beginn eine geringfügig reduzierte Squalenumsatzrate, die sich jedoch nach 30 Minuten immer mehr der des Wildtyps annäherte. Auch bei den durch GC-Analyse nachweisbaren Cyclisierungsprodukten und deren Anteil am Produktgemisch gab es keine Unterschiede zum Wildtyp. Aus dem Alignment der SHC-Sequenzen geht hervor, daß diese Deletion keine konservierten Sequenzbereiche betrifft, da das QW6-Motiv erst mit der 17. Aminosäure beginnt. Die Röntgenstruktur der SHC zeigt zudem, daß sich der N-Terminus des Enzyms an der Oberfläche der Domäne 1 und räumlich weit vom aktiven Zentrum des Enzyms und dessen Zugangskanal entfernt befindet (siehe **Abbildung 38**). Aus diesem Grund ist es nicht verwunderlich, daß eine Deletion in diesem Bereich keine Auswirkung auf die Enzymaktivität hat. Hinzu kommt, daß bei der Röntgenstrukturanalyse der SHC die Position der ersten sieben Aminosäuren nicht bestimmt werden konnte (siehe **Tabelle 8**). Dies deutet darauf hin, daß diese Aminosäuren in ihrer Position nicht durch Wechselwirkungen mit anderen Proteinbereichen stabilisiert sind. Es ist deshalb unwahrscheinlich, daß eine Deletion dieser N-terminalen Aminosäuren zu einer Destabilisierung der Proteinstruktur führt. Auch dies erklärt, warum die DelN1-Mutante eine dem Wildtyp entsprechende Enzymaktivität aufweist.

Bei der **DelN2-Mutante** wurden durch die Deletion der Aminosäuren A2 bis N39 im Vergleich zur DelN1-Mutante dagegen ein ca. 6× so großer Sequenzbereich deletiert, der das komplette QW6-Motiv umfaßt. Bei der Mutagenese wurde durch den Mutationsprimer neben der Deletion eine zusätzliche *Eco72* I-Schnittstelle erzeugt. Sowohl durch das dadurch veränderte Restriktionsfragmentmuster als auch durch die Sequenzierung des betroffenen Genbereichs konnte die erfolgreiche Deletion auf DNA-Ebene nachgewiesen werden. Da jedoch kein Protein dieser Mutante isoliert werden konnte, muß hier ein Problem bei der Proteinexpression oder Proteinreinigung vorliegen. Wie **Abbildung 38** zeigt, ist es sehr wahrscheinlich, daß das His₆-tag durch die Deletion ins Molekülinnere verlagert wurde und deshalb nicht mehr mit der NTA-Agarose wechselwirken kann. Dies würde erklären, warum kein Protein in den Eluatfraktionen nachgewiesen werden konnte. Da aber auch im Säulendurchlauf keine SHC-Bande im SDS-PAGE nachgewiesen werden konnte, könnte die Deletion des konservierten N-terminalen Sequenzmotivs auch zu einer so massiven Störung der Proteinstruktur des $\alpha 6/\alpha 6$ -Barrels der Domäne 1 geführt haben, daß dieses defekte Protein in der Zelle sofort proteolytisch abgebaut wird und deshalb nicht nach-

gewiesen werden kann. Damit wäre auch klar, warum im Rohextrakt auch bei Übernachtinkubationen bei 50 und 60 °C keine Enzymaktivität nachweisbar war. Alternativ wäre noch möglich, daß die DelN2-SHC inaktiv ist und nur in so geringer Menge exprimiert wird, daß sie vor dem Hintergrund der restlichen Proteine der Bakterienzellen im SDS-PAGE nicht identifiziert werden kann. Der immunologische Nachweis einer Proteinbande mit dem erwarteten Molekulargewicht durch den Anti-SHC-Antikörper im Rohextrakt dürfte dagegen auf unspezifische Kreuzreaktionen des Antikörpers mit *E. coli*-Proteinen zurückzuführen sein, wie die zahlreichen weiteren markierten Banden vermuten lassen. Da keine Totalsequenzierung des DelN2-SHC-Gens durchgeführt wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, daß neben der beabsichtigten DelN2-Mutagenese eine weitere zufällig aufgetretene Mutation zu einem Leserastersprung oder zu einem vorzeitigen Translationsstop und damit zu einem inaktiven SHC-Fragment führt.

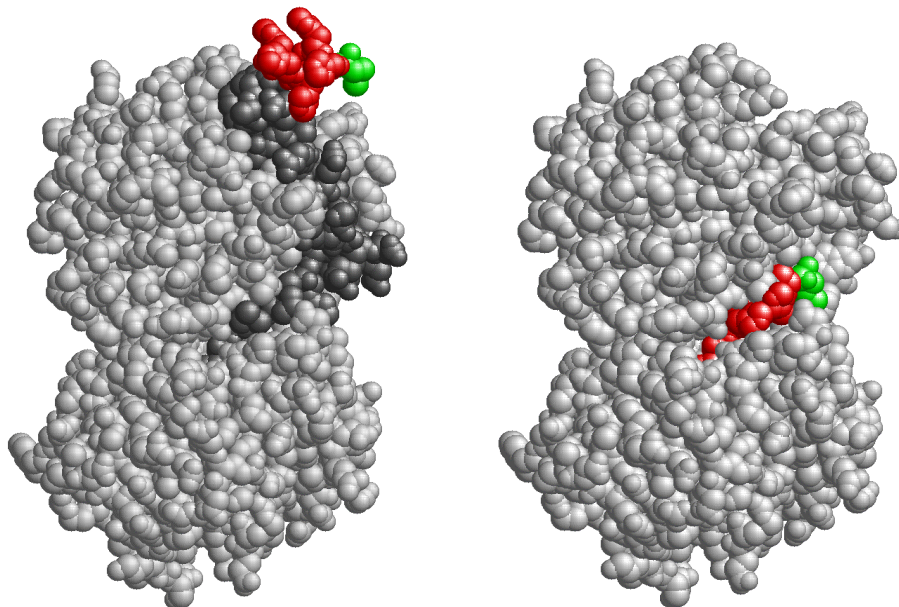


Abbildung 38: Kalottenmodelle der SHC von *A. acidocaldarius* mit einer Simulation der N-terminalen Deletionen DelN1 (links) und DelN2 (rechts). Ausgehend von der Wildtypstruktur wurden die entsprechenden N-terminalen Aminosäuren aus der Struktur entfernt bzw. durch das Start-Methionin (grün) und die sechs Histidine des His₆-tags (rot) ersetzt. Die der bei der DelN2-Mutante deletierten N-terminalen Aminosäuren sind links bis zum Asn39 dunkelgrau hervorgehoben.

4.4.2 C-terminale Deletionen

Bei der **DelC1-** sollten die letzten 14 Aminosäuren deletiert werden. Da die mit dem Mutageneseprimer einzuführende Restriktionsschnittstelle im SHC-Gen nicht nachgewiesen werden konnte, konnte die erfolgreiche Bindung des Primers an die DNA nicht nachweisen werden. Auch bei der **DelC3-Mutante**, bei der eine Deletion der letzten 39 Aminosäuren

durch Insertion von Stop-Codons im Leseraster des SHC-Gens erzielt werden sollte, gelang dies nicht. Bei der DelC1-Mutante war der Mutageneseprimer so konstruiert, daß er mit einer Hälfte an die pCyc-Sequenz des SHC-Stop-Codons und die darauffolgenden 18 Nukleotide binden sollte. Von OCHS wurde bei der Sequenzierung des SHC-Gens im Abstand von zwei Nukleotiden nach dem Stop-Codon ein „inverted repeat“ von 10 Nukleotiden Länge gefunden, welches die Ausbildung einer Haarnadel-Schleifenstruktur ermöglicht (OCHS, 1990). Die Ausbildung einer derartigen Sekundärstruktur der DNA könnte die Bindung des Mutageneseprimers an den Sequenzabschnitt unmittelbar nach dem Stop-Codon des SHC-Gens verhindern. Bei der DelC3-Mutante sollte eine Hälfte des Mutageneseprimers an den C-terminalen DNA-Bereich des QW1 binden. Da die Sequenz G-X-W den am stärksten konservierten Teil der QW-Motive darstellt und im SHC-Gen achtmal vorkommt, könnten in diesem Fall Fehlpaarungen des Mutageneseprimers mit den DNA-Sequenzen der verschiedenen QW-Motive für das Nichtgelingen der DelC3-Mutation verantwortlich sein.

Nach dem Scheitern der DelC1-Mutagenese sollte die Deletion der letzten 14 Aminosäuren bei der **DelC2-Mutante** mit Hilfe zweier PCR-Primern erreicht werden. Ein entsprechend verkürztes PCR-Amplifikat wurde isoliert und konnte über entsprechende mit den Primern eingeführten Restriktionsschnittstellen in den Vektor pQE-8 kloniert werden. Die Sequenz des Klonierungsprodukts war nach einer Restriktionsverdauanalyse jedoch nicht mit der SHC-Gensequenz identisch, ohne das dafür eine Ursache festgestellt werden konnte. Auch von FEIL wurde über ähnliche Probleme bei Verwendung der pQE-Vektoren berichtet (FEIL, 1997).

Nachdem also keine einzige der geplanten C-terminalen Deletionsmutanten und keine größere N-terminalen Deletion als die der DelN1-Mutante analysiert werden konnte, müssen diese Versuche weitestgehend als gescheitert angesehen werden. Die inzwischen bekanntgewordene 3D-Struktur der SHC kann ein solches Ergebnis jedoch leicht erklären. Sieht man nämlich von den ersten neun sowie den letzten vier Aminosäuren ab, gehören die nächsten terminalen Aminosäuren der SHC entweder zur α -Helix $\alpha 1$ oder $\alpha 22$. Wie aus **Abbildung 5 [B]** hervorgeht, sind beide Helices Teil der $\alpha 6/\alpha 6$ -Struktur der Domäne 1 der Cyclase und stehen in engem Kontakt mit den benachbarten α -Helices $\alpha 12$, $\alpha 20$ und $\alpha 21$. Dieser Struktur wurde zusammen mit den QW-Motiven von WENDT *et al.* (1997) eine Funktion für die Stabilisierung der SHC gegen die bei der exergonischen Cyclisierungsreaktion freiwerdenden Energie zugeschrieben, die inzwischen auch experimentell belegt ist (SATO & HOSHINO, 1999a, 2001). Eine Deletionen in diesem Bereich wird das Protein

wahrscheinlich derartig destabilisieren, daß bei einer solchen SHC auch keine Enzymaktivität mehr nachweisbar ist. Die wenigen in der Kristallstruktur der SHC fehlenden Aminosäuren (siehe **Tabelle 8**) dürften deshalb mit großer Wahrscheinlichkeit die einzigen Aminosäuren sein, deren Deletion vom Enzym toleriert wird. Damit dürfte die Röntgenstruktur der SHC zugleich die minimale aktive Größe dieses Enzyms darstellen.

4.5 Bestimmung der Trypsinschnittstelle in der SHC-Sequenz

Für eine erfolgreiche Proteinreinigung durch Metallaffinitätschromatographie ist es notwendig, daß das His₆-tag an der Moleküloberfläche liegt, um mit dem Säulenmaterial der Cu²⁺-NTA-Säule wechselwirken zu können. Die Probleme bei der Reinigung der DelN2-Mutante wiesen jedoch darauf hin, daß mit zunehmender Ausdehnung der terminalen Deletionen damit zu rechnen ist, daß das His₆-tag im Molekülinneren verschwindet. Um trotzdem Cyclasen mit noch größeren Deletionen isolieren zu können, sollte das N-terminale His₆-tag deshalb durch eines in einem zentralen Sequenzbereich der SHC ersetzt werden, dessen Lage durch die N- und C-terminalen Deletionen unberührt bleibt und damit in jedem Fall die Proteinreinigung ermöglicht.

Da zu diesem Zeitpunkt die Röntgenstrukturanalyse noch nicht abgeschlossen war, mußten für diesen Zweck geeignete Sequenzbereiche auf andere Weise identifiziert werden. Hier bot sich die von WENDT entdeckte Trypsinschnittstelle an (WENDT, 1994). Die bevorzugte Proteolyse der SHC an dieser Position ließ vermuten, daß dieser Sequenzabschnitt besonders exponiert an der Moleküloberfläche der Cyclase liegt. Dafür sprach, daß sich schon nach wenigen Minuten der Trypsineinwirkung ein 45 kDa-Fragment der SHC nachweisen läßt. Die von WENDT angegebene Position der Trypsinschnittstelle zwischen R233 und S234 war jedoch in der korrigierten Sequenz nicht mehr vorhanden. Aus diesem Grund wurde die N-terminale Sequenz des proteolytischen SHC-Fragments durch Edman-Abbau erneut bestimmt (siehe **3.5.2**).

Anhand der bestimmten Aminosäuren konnten zwei benachbarte Trypsinschnittstellen zwischen R222 und A223 sowie zwischen R238 und A239 identifiziert werden. Die beiden nur 15 Aminosäuren auseinanderliegenden Schnittstellen führen zu SHC-Fragmenten, die im Gel anhand ihrer Größe unterschieden werden können. **Abbildung 31** zeigt deutlich eine starke Bande oberhalb der 43 kDa-Markerbande und eine zweite schwächere Bande, deren Molekulargewicht dem Markerprotein entspricht. Die unterschiedliche Bandenstärke deutet darauf hin, daß eine der beiden Schnittstellen vom Trypsin bevorzugt wird. Aus dem MW der stärkeren Bande kann geschlossen werden, daß die bevorzugte

Trypsinschnittstelle zwischen R222 und A223 liegt, da hier mit einem C-terminalen Fragment mit einem MW von 45,8 kDa zu rechnen ist. Eine Proteolyse zwischen R238 und A239 liefert dagegen ein Fragment mit einem MW von 44,0 kDa (siehe **Tabelle 10**), was nahezu dem 43-kDa-Markerprotein entspricht und damit ebenfalls gut mit dem Befund im SDS-Gel übereinstimmt. Weitere Banden sind unterhalb der 30 kDa-Markerbande zu sehen. Hier dürfte es sich um die entsprechenden N-terminalen SHC-Fragmente handeln. Daß diese Proteinbanden wesentlich weniger deutlich sichtbar sind, liegt vielleicht daran, daß diese SHC-Fragmente durch weitere tryptische Proteolyse abgebaut werden. Wie die Röntgenstruktur der SHC zeigt, liegen die beiden identifizierten Trypsinschnittstellen tatsächlich exponiert an der Oberfläche des Proteins (siehe **Abbildung 39**).

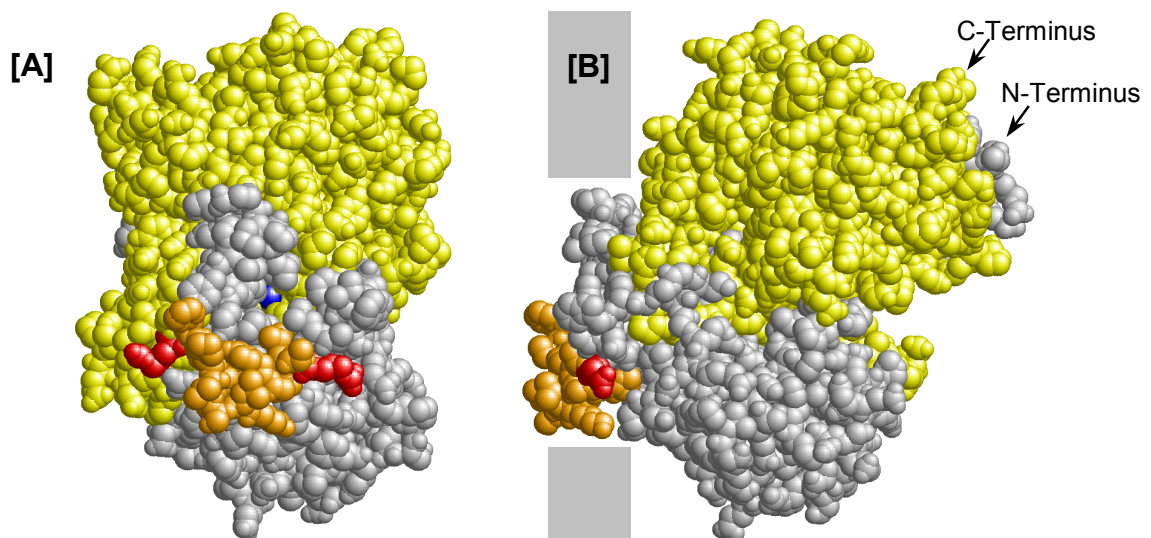


Abbildung 39: Zwei Ansichten eines Kalottenmodell der SHC von *A. acidocaldarius* mit den beiden bevorzugten Trypsinschnittstellen an der Moleküloberfläche. [A] die Arginin-Reste (rot) Arg223 (rechts) und Arg238 (links) der beiden Trypsinschnittstellen, die dazwischenliegenden 15 Aminosäuren (orange), darüber der Blick in den Kanal ins aktive Zentrum der SHC mit dem Inhibitor LDAO (blau) sowie die auf Arg238 folgenden C-terminalen Aminosäuren der SHC (44 kDa-Fragment; gelb). [B] um 90° nach rechts um die senkrechte Achse gedrehte Ansicht mit Arg223 (rot) und den N- und C-Termini der SHC. Deutlich sichtbar die vorstehende Membranbindungsdomäne der SHC mit einer schematischen Darstellung des hydrophilen Teils der Membran (grauer Balken; siehe auch **Abbildung 6**).

Da alle weiteren SHC-Mutanten mit einer veränderten Mutagenesestrategie und Proteinreinigung isoliert wurden (siehe unten), wurde die Identifizierung der Trypsinschnittstelle jedoch nicht mehr dazu verwendet, um an dieser Position ein His₆-tag einzufügen.

4.6 Mutagenese von Aminosäuren des aktiven Zentrums der SHC

Mehrere Gründe waren dafür verantwortlich, daß nach den bisherigen Experimenten ein Wechsel der Mutagenesestrategie sowie des Proteinreinigungsprotokolls vorgenommen wurde. So wurde mit dem Plasmid pCyc nur eine unbefriedigende Expression der SHC erreicht, da der *lacZ*-Promotor dieses Vektors und das Start-Codon der SHC durch eine ca. 220 bp lange DNA-Sequenz getrennt war (FEIL, 1997). Dies führte dazu, daß eine Expressionssteigerung durch IPTG-Zugabe kaum möglich ist. Sollten die Mutationen zu einer SHC mit verändertem Produktspektrum führen, wäre dies jedoch eine Voraussetzung, um damit die für die Strukturaufklärung neuer Produkte nötige Menge eben dieser Verbindungen zu erhalten. Aus diesem Grund wurden für alle weiteren Experimente der Vektor pKSHC (WENDT, 1994) verwendet. Durch einen optimalen Abstand zwischen dem starken Tac-Promotor und dem Start-Codon der SHC konnte hier eine durch IPTG deutlich induzierbare Proteinexpression erzielt werden. Da die vom pKSHC codierte SHC kein His-tag aufwies, konnte die bisher verwendete Proteinreinigung durch Metallaffinitätschromatographie über NTA-Agarose nicht mehr verwendet werden. Deshalb wurde für die Proteinreinigung jetzt eine Anionenaustauschchromatographie verwendet. Durch diesen Wechsel konnten auch die Probleme der bisher angewandten Proteinreinigungsmethode (wie schlechte SHC-Bindung an die Säule, Elution schon bei geringen Imidazol-Konzentrationen und dadurch häufige Verunreinigung der SHC-Fraktion durch andere Proteine) erfolgreich beseitigt werden, die bisher Qualität und Quantität der isolierten SHC eingeschränkt hatten. Mit der verwendeten Q Sepharose HP konnte nämlich eine sehr gute Bindung der SHC an das Säulenmaterial erreicht werden, sodaß bei Spülung der Säule mit Waschpuffer die SHC nicht ausgewaschen wurde, während Verunreinigungen entweder ohne Bindung mit dem Durchlauf ausgespült wurden oder eine so schwache Bindung an das Säulenmaterial aufwiesen, daß für deren Abtrennung schon geringe NaCl-Konzentrationen des Elutionspuffers ausreichend waren (siehe **Abbildung 16**). Dadurch konnte die SHC mit einem nur minimalen Anteil anderer Proteine isoliert werden.

Für den Wechsel von unspezifischen Deletionsmutagenesen zur gezielten Mutagenese einzelner Aminosäuren waren hauptsächlich zwei Gründe ausschlaggebend. Zum einen weist die Methode der Deletionsmutagenese in der durchgeführten Form generell einige Nachteile auf. Dazu gehört, daß eine eventuell festgestellte Änderung der Enzymaktivität keiner bestimmten Aminosäure zugeordnet werden kann, da die Deletionen immer mehrere Aminosäuren betreffen. Zudem steigt mit zunehmender Deletionsgröße die Wahrscheinlichkeit, daß eine Aktivitätsänderung der Cyclase viel eher auf eine durch die Deletion ver-

ursachte Strukturänderung des Proteins als auf die Deletion von katalytisch aktiven Aminosäuren zurückzuführen ist. Zudem erscheint es bei einer so komplexen Enzymreaktion wie bei der SHC generell fraglich, ob mit einer derartig unspezifischen Deletionsmutagenese außer einer Inaktivierung überhaupt eine andere Aktivitätsveränderung der Cyclase erreicht werden kann.

Entscheidend für den Übergang zur gezielten Mutagenese einzelner Aminosäuren waren jedoch hauptsächlich die inzwischen erzielten Fortschritte bei der Röntgenstrukturaufklärung der SHC. Damit lagen zunehmend Hinweise auf die Struktur des aktiven Zentrums vor und es wurde dadurch auch möglich, die Funktion einzelner Aminosäuren des aktiven Zentrums durch gezielten Austausch gegen Alanin (Alanin-scanning-Mutagenese) genauer zu analysieren. Da diese Aminosäure keine saure, basische, aromatische oder ausgesprochen hydrophobe Seitenkette besitzt, sollte dies die Interpretation der Auswirkung eines derartigen AS-Austausches erleichtern.

Durch die Röntgenstrukturanalyse der SHC war jedoch nicht geklärt, welche der mehrere Dutzend Aminosäuren, die zusammen das aktive Zentrum der SHC bilden (insgesamt befinden sich 45 AS im Abstand von 7,5 Å zum LDAO, siehe 4.4.2), eine katalytische Funktion haben und welche Reste nur zur Struktur des aktiven Zentrums beitragen. Die durchgeführten Mutageneseexperimente sollten zur Beantwortung dieser Frage beitragen. Dazu war es nötig, einzelne Aminosäuren des aktiven Zentrums für die Mutageneseexperimente auszuwählen. In Frage kamen dabei hauptsächlich konservierte aromatische Aminosäuren, bei denen aufgrund ihrer Position im aktiven Zentrum eine Beteiligung an der Stabilisierung intermediärer Carbokationen bei der Squalen-Cyclisierung angenommen werden konnte.

4.6.1 H451A-SHC

H451 unterscheidet sich durch zwei Eigenschaften von den anderen in dieser Arbeit für die Mutagenesen ausgewählten Aminosäuren. Zum einen handelt es sich um die einzige nicht-aromatische Aminosäure und zum zweiten gehört H451 nicht zu den Aminosäuren, die mit ihren Seitenketten die Wand des Hohlraums des aktiven Zentrums auskleiden. Vielmehr ist es durch einige Aminosäuren von diesem Hohlraum getrennt, die zusammen den oberen Abschluß des aktiven Zentrums bilden (siehe **Abbildung 40**). Dies zeigt sich auch daran, daß bei den anderen für die Mutageneseexperimente ausgewählten Aminosäuren der kürzeste Abstand zwischen Seitenkette und LDAO im aktiven Zentrum ca. 3,5 – 4,5 Å beträgt, während er zwischen H451 und LDAO 6,5 Å und mehr beträgt. Dieser größere

Abstand hat zur Folge, daß H451 keinen direkten Kontakt zum Squalen im aktiven Zentrum hat.

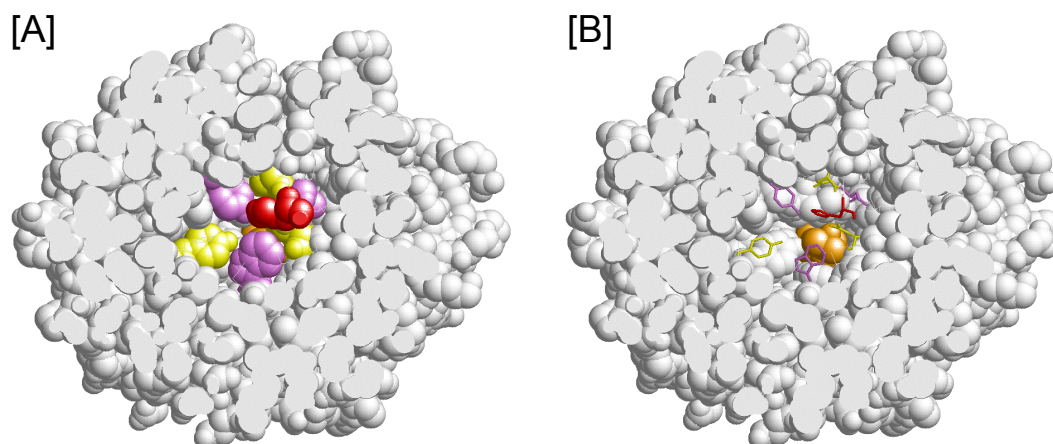


Abbildung 40: Querschnitt durch das Kalottenmodell der Domäne 1 der SHC mit der Lage von H451. [A] In rot die Seitenkette von H451, die in einen kleinen Hohlraum hineinragt, der oberhalb des aktiven Zentrums der SHC liegt (einige Aminosäuren sind ausgeblendet; siehe auch **Abbildung 6**). Darunter die sechs Aminosäuren, deren Seitenketten den oberen Hohlraum vom Hohlraum des aktiven Zentrums abtrennen. In der Mitte oben D447 (gelb); daran anschließend im Uhrzeigersinn in wechselnden Farben V448, D376, W312, Y612 und Y495. [B] Werden diese Aminosäuren nicht als raumfüllende Kalottenmodelle dargestellt, dann geben sie den Blick in das darunterliegende aktive Zentrum der SHC mit dem Inhibitor LDAO (orange) frei.

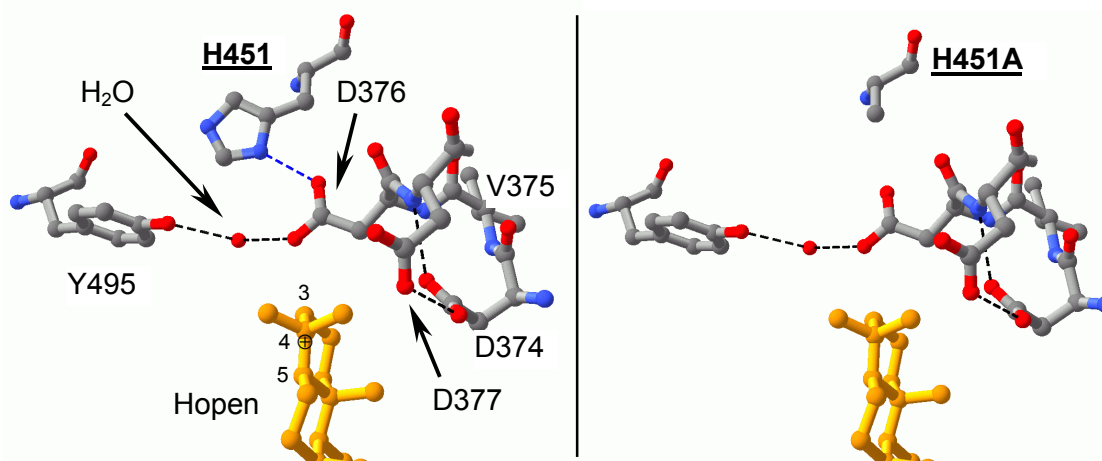


Abbildung 41: Struktur des aktiven Zentrums der SHC mit einem hineinmodelliertem Hopenmolekül beim WT [links] und die Computersimulation (siehe 3.4.5) der H451A-Mutation [rechts]. Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Aminosäuren sind als gestrichelte Linien dargestellt. Vom Hopen ist nur der A- (oben) und B-Ring (unten) dargestellt und beim A-Ring sind die Atome C-3 bis C-5 durchnummeriert: C-3 wird vom darüberliegenden D376 protoniert, C-4⁺ ist das erste intermediäre Carbokation und die Bindung zwischen C-4 und C-5 führt zum ersten Ringschluß bei der Squalen-Cyclisierung.

Die Seitenkette von H451 liegt direkt über D376 und ist über eine Wasserstoffbrücke mit diesem verbunden (siehe **Abbildung 40 & 41**). Beide Aminosäuren liegen wahrscheinlich in protonierter Form vor, was die Acidität von D376 erhöhen soll. Dadurch kann letzteres leichter als katalytische Säure wirken und mit der Protonierung der terminalen Doppelbindung von Squalen dessen Cyclisierungsreaktion einleiten. Das dabei entstehende erste intermediäre Carbokation kann dann durch die negative Ladung der beiden benachbarten Aspartat-Reste D374 und D377 stabilisiert werden, während die nach der Squalenprotonierung am D376 verbleibende negative Ladung durch die positive Ladung von H451 kompensiert werden kann. Zusätzlich wird D376 über eine Wasserstoffbrücke zu Y495 über ein Wassermolekül stabilisiert (WENDT, 1997; WENDT *et al.*, 1997, 1999). Die Nähe von H451 zu den für die Initiation der Cyclisierungsreaktion entscheidenden Aminosäuren D374, D376 und D377 ließen also vermuten, daß diese Aminosäure ebenfalls einen Einfluß auf die Squalen-Cyclisierung hat, der durch die Mutation H451A näher untersucht werden sollte.

Bei der Analyse der H451A-Mutante konnte erstmals eine Reduktion der Thermostabilität der SHC durch einen Aminosäureaustausch festgestellt werden. Bisherige SHC-Mutanten hatten in dieser Hinsicht keine Unterschiede zum SHC-Wildtyp gezeigt (FEIL, 1997). Diese erniedrigte Thermostabilität führte dazu, daß bei der Proteinreinigung nach dem Standardprotokoll (d.h. Hitzedenaturierungsschritt bei 60 °C) keine Cyclase isoliert werden konnte. Erst nach Absenkung der Temperatur dieses Reinigungsschrittes auf 50 °C bei gleichzeitiger Verkürzung der Inkubationsdauer war am Ende der Reinigungsprozedur noch ausreichend Protein im Säuleneluat vorhanden (siehe **3.3.4**). Damit nahm jedoch auch der Grad der Verunreinigungen der SHC-Fraktion durch nichtdenaturierte *E. coli*-Proteine zu. Der Proteingehalt der Eluatfraktion war damit nur noch zum Teil auf die SHC zurückzuführen, weshalb die tatsächliche SHC-Konzentration nicht mehr eindeutig bestimmt werden und nur noch annäherungsweise durch gel-densitometrische Analyse abgeschätzt werden konnte. Wegen der Fehleranfälligkeit dieser Methode wurden jedoch aus den Meßdaten keine Angaben zur spezifischen Aktivität und zur Kinetik der SHC-Mutanten abgeleitet. Auch aus diesem Grund konzentrierten sich die Arbeiten ganz auf die Analyse und Charakterisierung des Produktspektrums der Mutanten.

Neben der verringerten Thermostabilität konnte bei der Analyse der H451A-Mutante auch eine deutlich reduzierte Enzymaktivität festgestellt werden. So war der relative Squalenumsatz nach 14-stündiger Inkubation bei 50 °C im Vergleich zum WT auf ca. ein Drittel reduziert (siehe **Tabelle 4**). Deutliche Veränderungen im Produktspektrum wurden

dagegen nicht beobachtet (MERKOFER *et al.*, 1999). Hopen und Diplopterol sind mit einem Produktanteil von 85 bzw. 10 % die Hauptprodukte dieser Cyclase. Daneben konnten mit Dammara-13(17),24-dien, 17-Isodammara-12,24-dien und 17-Isodammara-20(21),24-dien noch drei der sechs von PALE-GROSDÉMANGE *et al.* (1998) bei der WT-SHC identifizierten Nebenprodukte nachgewiesen werden. Diese werden auch von der WT-SHC in größerer Menge als die restlichen drei Verbindungen produziert. Daß letztere im Produktspektrum der H451A-SHC nicht nachgewiesen werden konnten, dürfte deshalb hauptsächlich auf die geringe Aktivität dieser Cyclase zurückzuführen sein.

Die deutliche Reduktion der Enzymaktivität durch diese Mutation zeigt, daß die Aminosäure H451 in der Tat eine Rolle bei der Initiierung der Cyclisierungsreaktion durch D376 spielt. Auch der Austausch von Y495 (durch die Mutation Y495F), die als zweite Aminosäure über Wasserstoffbrücken mit D376 in Kontakt steht, führt zu einer deutlichen Verringerung der relativen Enzymaktivität (FÜLL & PORALLA, 2000). Die noch vorhandene Restaktivität belegt aber auch, daß die Acidität von D376 auch ohne H451 für eine – wenn auch reduzierte – Squalenprotonierung ausreicht. Auch die Tatsache, daß H451 bei den bekannten Squalen-Hopen-Cyclasen nicht konserviert ist (MERKOFER *et al.*, 1999), zeigt, daß diese Aminosäure nicht essentiell für die Enzymaktivität sein kann. Wie aus dem Sequenzalignment hervorgeht (siehe **Anhang**), kommt an dieser Position nur bei den Cyclasen der *Alicyclobacillus*- und *Streptomyces*-Arten sowie bei den Cyclasen aus *Magnaporthe*, *Desulfitobacterium* und *Rhodopirellula* ein Histidin vor. Alle anderen SHC weisen an dieser Position dagegen ein Arginin auf. Wie die Enzymaktivität der H451R-Mutante zeigt, kann dieses Arginin tatsächlich die Funktion des Histidins übernehmen. Da die Enzymtests der H451A-Mutante (diese Arbeit) und der H451R-Mutante (HOSHINO & SATO, 2002) unter verschiedenen Bedingungen durchgeführt wurden, können die erzielten Ergebnisse nur eingeschränkt miteinander verglichen werden, doch deuten die Daten darauf hin, daß die Aktivität der H451R-SHC bei einstündiger Inkubation fast viermal höher als die der H451A-Mutante ist.

Im Gegensatz zur beobachteten Restaktivität der H451A-Mutante konnte bei einer H451F-SHC keine Enzymaktivität mehr nachgewiesen werden (HOSHINO & SATO, 2002). Diese Inaktivierung der Cyclase ist möglicherweise auf eine Veränderung der Proteinstruktur zurückzuführen, die die Einführung einer aromatischen Aminosäure an dieser Position nach sich ziehen kann.

Bei den Oxidosqualen-Lanosterol-Cyclasen wurde zuerst vermutet, daß die Aminosäuren H146/D456 die Funktion von D376/H451 der SHC übernehmen (COREY *et al.*, 1997b),

doch scheint H146 zu weit vom aktiven Zentrum entfernt zu sein. Bis heute konnte bei den OSC keine dem H451 äquivalente Aminosäure identifiziert werden. Da die Protonierung einer Epoxidbindung beim Oxidosqualen leichter möglich ist, als die Protonierung einer C-C-Bindung beim Squalen, können die OSC offensichtlich auf die unterstützende Wirkung einer dem H451 entsprechenden Aminosäure verzichten (WENDT *et al.*, 2000).

Die Struktur der SHC liefert auch Hinweise für eine Erklärung der bei der H451A-Mutante beobachteten reduzierten Thermostabilität. So ist die Aminosäure H451 Teil der Helix $\alpha 16$, welche zusammen mit fünf weiteren den inneren Ring von α -Helices der $\alpha 6/\alpha 6$ -Struktur der Domäne 1 bildet (siehe **Abbildung 5 [B]**). Innere und äußere Helices sind durch zahlreiche Interaktionen mit den QW-Motiven, die auf die äußeren Helices folgen, miteinander verknüpft. So ist die Helix $\alpha 16$ mit der äußeren Helix $\alpha 17$ über das QW4-Motiv verbunden. Den zahlreichen Wechselwirkungen mit Aminosäuren der QW-Motive wird eine Stabilisierung der Cyclase gegen thermische Denaturierung zugeschrieben (WENDT, 1997; WENDT *et al.*, 1997), was durch Mutagenese konservierter Aromaten des QW4-Motives inzwischen auch experimentell nachgewiesen werden konnte (SATO & HOSHINO, 1999a). Somit erscheint es einleuchtend, daß der Austausch von H451 gegen Alanin zu einer veränderten Struktur der Helix $\alpha 16$ führen kann und über veränderte Interaktionen mit dem QW4-Motiv und der Helix $\alpha 17$ letztendlich zu einer Destabilisierung des Proteins gegenüber thermischer Denaturierung führt.

4.6.2 W489A-SHC

Im Gegensatz zum H451 ist die Aminosäure W489 direkt an der Auskleidung des Hohlraums des aktiven Zentrums der SHC beteiligt. Dabei ist die Seitenkette so ausgerichtet, daß das Indolringsystem mit seiner Ringfläche zum aktiven Zentrum weist (siehe **Abbildung 42**). Es wurde vermutet, daß W489 mit den π -Elektronen des aromatischen Ringsystems sowie durch seine günstige Lage im oberen Bereich des aktiven Zentrums an der Stabilisierung des intermediären Carbokations C-10⁺ beteiligt ist, welches durch die Cyclisierung des A-Rings entsteht (WENDT, 1997; WENDT *et al.*, 1999). Auch die Tatsache, daß W489 eine der am stärksten konservierten Aminosäuren bei Triterpen-Cyclasen ist, kann als Indiz für die wichtige Funktion dieser Aminosäure gewertet werden. Wie das Alignment der bekannten Triterpen-Cyclasesequenzen zeigt, ist W489 mit Ausnahme der *Archaea*-Sequenzen von *Pyrococcus* und *Methanopyrus* bei allen anderen SHC sowie bei allen OSC vorhanden (siehe **Anhang**).

Ein Austausch dieser aromatischen Aminosäure gegen Alanin sollte deshalb zu einer deutlichen Störung der Squalen-Cyclisierung, möglicherweise sogar zu einem Reaktionsabbruch auf der Stufe des C-10⁺-Carbokations führen. In diesem Fall sollte im Enzymtest dieser Mutante ein neues monocyclisches Produkt zu finden sein.

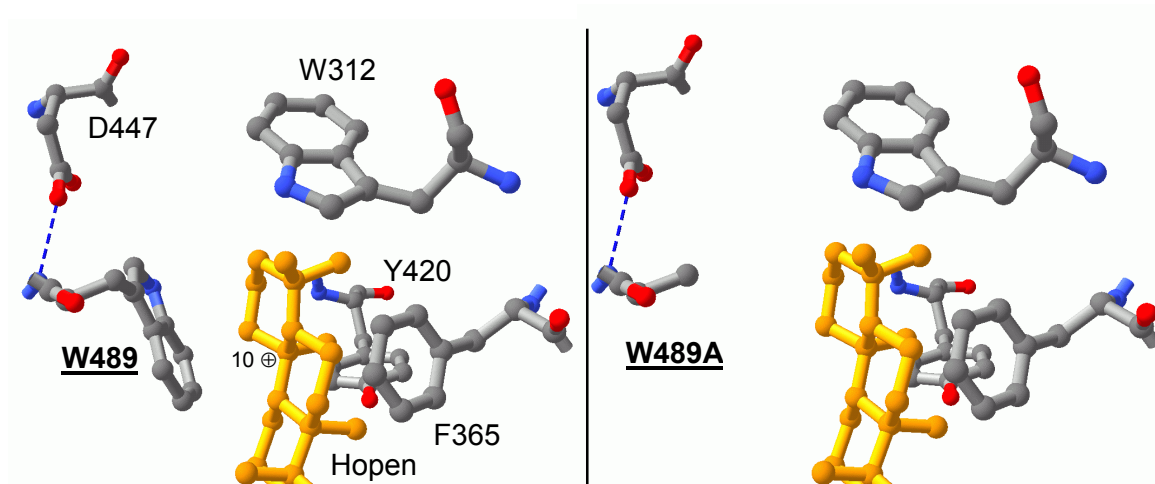


Abbildung 42: Struktur des aktiven Zentrums der SHC mit einem hineinmodellierten Hopanmolekül beim WT [links] und die Computersimulation der W489A-Mutation [rechts]. Wasserstoffbrücken zwischen den einzelnen Aminosäuren sind als gestrichelte Linien dargestellt. Vom Hopan sind nur die A-, B- und C-Ringe dargestellt und die Position des zweiten intermediären C-10⁺-Carbokations zwischen dem A- und B-Ring markiert.

Die Analyse der W489A-SHC konnte diese Vorhersagen jedoch nur zum Teil bestätigen. So konnte in der Tat gezeigt werden, daß sich ein Austausch dieser Aminosäure negativ auf die Squalen-Cyclisierung auswirkt, da die Mutante mit einem Squalenumsatz von < 7 % nach 14-stündiger Inkubtion im Vergleich zur WT-SHC die niedrigste Enzymaktivität aller in dieser Arbeit untersuchten Mutanten aufwies (siehe **Abbildung 29**). Diese Mutation führt jedoch nicht zu einem vorzeitigen Abbruch der Cyclisierungsreaktion, da im Enzymtest weiterhin Hopan als Produkt nachweisbar war (MERKOFER *et al.*, 1999). Nebenprodukte wurden nicht beobachtet, was eventuell jedoch nur eine Folge der geringen Aktivität dieser Cyclase war. Wie bei der H451A-Mutation wies auch die W489A-SHC im Vergleich zum Wildtyp-Enzym eine reduzierte Thermostabilität auf.

Inzwischen liegen zu W489 die Ergebnisse weiterer Mutageneseexperimente vor. Demnach führt der Austausch W489L zu einer vollständigen Inaktivierung der Cyclase (SATO *et al.*, 1998b). Die Mutation W489F liefert dagegen eine Cyclase, bei der neben Hopan auch Diplopterol und 17-Isodammara-20(21),24-dien im Verhältnis von 73,7 : 6,6 : 19,6 als Reaktionsprodukte nachweisbar sind (SATO & HOSHINO, 1999a). Nach HOSHINO & SATO (2002) konnten mit Isodammara-12,24-dien und Dammara-13(17),24-dien noch zwei weitere tetracyclische Nebenprodukte nachgewiesen werden. Angaben zu den

Mengenverhältnissen dieser beiden Substanzen wurden jedoch nicht gemacht. Damit führt der homologe Aromatenaustausch W489F zu einer Cyclase, die fast alle von der WT-SHC bekannten Produkte bildet. Dagegen ist bei diesem Enzym im Vergleich zum WT die relative Enzymaktivität auf nur noch 2,6 % reduziert (SATO & HOSHINO, 1999a).

Die vollständige Inaktivierung der SHC durch die Mutation W489L sowie die drastische Reduktion der Enzymaktivität um ca. 93 - 97 % durch die Mutationen W489A und W489F belegen die Bedeutung dieser Aminosäure für die Cyclisierungsreaktion. Allerdings bleibt die genaue Funktion von W489 bei dieser Reaktion weiter offen. Die verringerte Aktivität von W489F kann mit der Beeinträchtigung möglicher π -Kation-Interaktionen durch den Austausch des Indolrings des Tryptophans gegen den kleineren Phenylring des Phenylalanins erklärt werden (SATO & HOSHINO, 1999a). Unklar bleibt jedoch, weshalb die Mutante W489A trotz Verlust des aromatischen Ringsystems eine größere Restaktivität als W489F aufweist. Aufgrund kinetischer Analysen dieser W489F-Mutante wird von HOSHINO & SATO (2002) angenommen, daß diese Aminosäure neben der Stabilisierung des intermediären Carbokations auch eine Funktion für die Substratbindung hat.

Da bei keiner dieser W489-Mutanten ein monocyclisches Produkt nachweisbar ist, scheint die Cyclisierung auch nicht auf der Stufe des C-10⁺-Carbokations abubrechen. Demnach scheint diese Aminosäure auch nicht entscheidend an dessen Stabilisierung beteiligt zu sein. Eine rein sterische Funktion für die korrekte Faltung von Squalen im aktiven Zentrum erscheint ebenfalls unwahrscheinlich, da auch beim Ersatz des großen Indolrings des Tryptophans durch die kleine Seitenkette des Alanins (siehe **Abbildung 42**) das Substrat weiterhin korrekt gefaltet wird und die Cyclisierung zum Hopan erfolgen kann. Offensichtlich wird das C-10⁺-Carbokation noch durch andere Aminosäuren in der Umgebung von W489 stabilisiert, sodaß der Verlust dieser Aminosäure toleriert werden kann. Dies würde erklären, warum bei der W489A-Mutante die Cyclisierungsreaktion nicht vorzeitig abbricht, sondern zum Hopan führt. Da bei den Mutanten D377C/N, Y420W, L607F/W und Y612A inzwischen monocyclische Reaktionsprodukte nachgewiesen werden konnten, scheinen diese Aminosäuren wohl eher als W489 die Funktion der C-10⁺-Carbokationstabilisierung zu übernehmen (SATO & HOSHINO, 2001; SATO *et al.*, 2002; HOSHINO & SATO, 2002).

Sowohl die Mutation W489A (diese Arbeit) als auch die Mutation W489F (SATO & HOSHINO, 1999a) haben eine reduzierte Thermostabilität der Cyclase zur Folge. Dies deutet darauf hin, daß durch die Mutation konservierter Aromaten, die in den Hohlraum des aktiven Zentrums hineinragen, die Struktur des Enzym genauso destabilisiert werden

kann, wie durch Mutationen, die die QW-Motive an der Proteinoberfläche betreffen, deren Bedeutung für die Thermostabilität der SHC inzwischen nachgewiesen wurden (SATO & HOSHINO, 1999a, 2001).

4.6.3 F601A-SHC

Mit F601 wurde eine weitere aromatische Aminosäure für die Mutagenese ausgewählt, die innerhalb der Triterpen-Cyclasen stark konserviert ist. Mit Ausnahme der Sequenzen von *Rhodospirellula*, *Desulfotobacterium* sowie der *Bacillus*- und der *Archaea*-Arten ist diese Aminosäure bei allen anderen SHC sowie bei allen OSC vorhanden (siehe **Anhang**). Wie bei W489 ist auch bei F601 die Seitenkette so ausgerichtet, daß die Ringfläche des Phenylrings zum Hohlraum des aktiven Zentrum weist (siehe **Abbildung 43**).

Sollte die Squalen-Cyclisierung wie in **Abbildung 7** dargestellt gleich zu jeweils sechsgliedrigen A-, B-, C- und D-Ringen führen, dann kann aus der Position von F601 im aktiven Zentrum keine Funktion abgeleitet werden, da sich diese Aminosäure unter diesen Voraussetzungen nicht in der Nähe der zu postulierenden intermediären Carbokationen befindet. Nimmt man dagegen an, daß bei der Squalen-Cyclisierung zuerst ein 5-gliedriger D-Ring entsteht (der dann in einem zweiten Schritt zum sechsgliedrigen Ring erweitert wird), dann könnte F601 an der Stabilisierung des dabei entstehenden C-18⁺-Carbokations beteiligt sein (siehe **Abbildung 44**; WENDT, 1997; WENDT *et al.*, 1999). Da bei der WT-SHC mehrere tetracyclische Nebenprodukte mit einem 6/6/6/5-Ringssystem nachgewiesen wurden, wurde von PALE-GROSDEMANGE *et al.* (1998) eine solche Ringerweiterung des D-Rings als Zwischenschritt bei der Hopfen-Biosynthese in Betracht gezogen. Schon vorher wurde vermutet, daß die Bildung des C-Rings bei der Lanosterol-Biosynthese über eine derartige Ringerweiterung verläuft (COREY *et al.*, 1995).

Wie die Analyse der Reaktionsprodukte der F601A-SHC zeigt, hat die Mutation F601A erstmals zu einer Squalen-Cyclase mit einem deutlich verändertem Produktspektrum geführt. Während der Produktanteil von Diplopterol mit 10 % unverändert blieb, ist der des Hopfens im Vergleich zum WT mit nur noch 44 % fast halbiert worden. Dagegen stieg der Anteil von 17-Isodammara-20(21),24-dien um das 17,5-fache an, sodaß diese Verbindung jetzt mit einem Produktanteil von rund 23 % das zweithäufigste Produkt dieser Mutante bildet (MERKOFER *et al.*, 1999). Der Anteil der anderen bekannten tetracyclischen Nebenprodukte erhöhte sich im Vergleich zur WT-SHC ebenfalls um das 3 – 5-fache, blieb damit jedoch immer unter dem Produktanteil des Diplopterols. Zusätzlich zu den auch schon von der WT-SHC bekannten tetra- und pentacyclischen Nebenprodukten konnten im

Produktgemisch der F601A-SHC noch drei weitere Produkte nachgewiesen werden, deren Struktur jedoch nicht aufgeklärt werden konnte (siehe **Tabelle 5**).

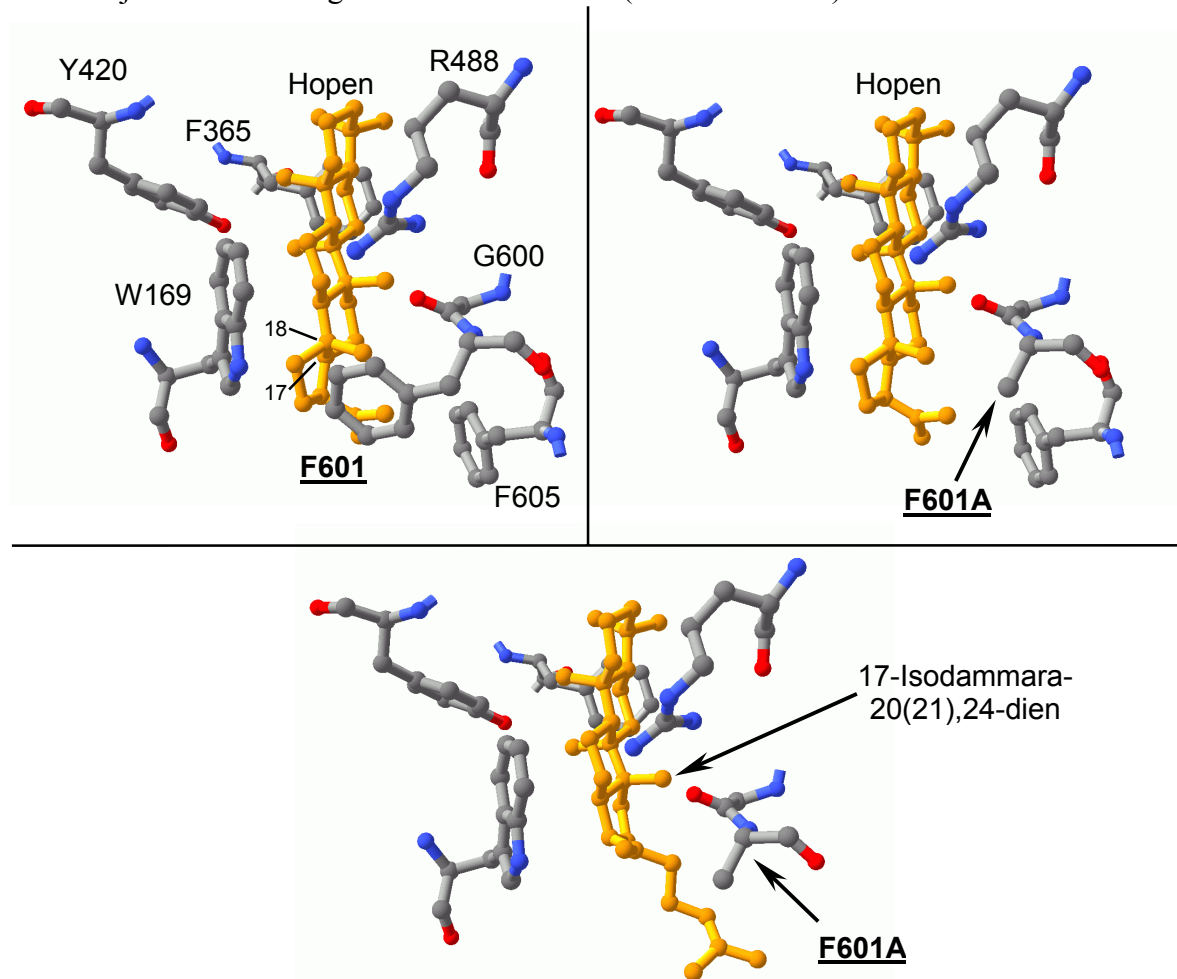


Abbildung 43: Struktur des aktiven Zentrums der SHC beim WT mit einem hineinmodellierten Hopenmolekül [oben links] sowie die Computersimulation der F601A-Mutation mit einem Hopenmolekül [oben rechts] bzw. mit einem 17-Isodammara-20(21),24-dien-Molekül [unten] im aktiven Zentrum. Beim D-Ring des Hopens sind die Atome C-17 und C-18 bezeichnet. Beim Modell des Isodammaradiens soll die Lage des tetracyclischen Ringsystems im aktiven Zentrum gezeigt werden, während die Struktur der Seitenkette ignoriert werden kann. Da die 3D-Struktur des Isodammaradiens unabhängig von der Struktur des aktiven Zentrums der SHC berechnet wurde (siehe 3.4.4), kommt es bei Einfügung ins aktive Zentrum zu einer Überschneidung der Seitenkette mit der von F605, die deshalb in der unteren Darstellung ausgeblendet wurde. In der Realität findet diese Überschneidung nicht statt, da die Isodammaradien-Seitenkette ihre Struktur durch ihre Flexibilität den umgebenden Aminosäuren anpassen kann.

Die erste dieser Verbindungen weist im GC-Chromatogramm mit 5,8 min eine Retentionszeit auf, die der von γ -Polypodatetraen am nächsten kommt, welches bei der Y420A-Mutante nachgewiesen wurde (siehe unten). Da sich die Massenspektren jedoch deutlich voneinander unterscheiden, muß es sich hier um eine andere Verbindung handeln. Auch von HOSHINO *et al.* (1999) wurde die F601A-Mutante analysiert und dabei wurde ebenfalls kein γ -Polypodatetraen entdeckt. Dafür berichten HOSHINO *et al.*, daß von ihnen

im Produktgemisch dieser Mutante noch die tricyclischen Verbindungen $13\alpha(\text{H})$ - und $13\beta(\text{H})$ -Malabaricatrien nachgewiesen werden konnten. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da hier im Produktgemisch keine neuen Verbindungen in der von HOSHINO *et al.* für die beiden Malabaricatriene angegebenen Mengen (8,8 bzw. 5,5 % des gebildeten Hopens) gefunden wurden. So handelt es sich bei der zweiten unbekanntem Verbindung mit einer GC-Retentionszeit von 6,3 min (siehe **Tabelle 5**) sicher nicht um das $13\alpha(\text{H})$ -Malabaricatrien, da dieses eine kürzer RT von nur 6,1 min aufweist (siehe **Abbildung 25** und **Tabelle 6**). Mit einem Produktanteil nahe der Nachweisgrenze von nur 0,7 % wird es auch in einer deutlich geringeren Menge gebildet, als es von HOSHINO *et al.* (1999) angegeben wird. Ob es sich hier um das $13\beta(\text{H})$ -Malabaricatrien handelt, konnte nicht geklärt werden, da diese Verbindung für Vergleichsanalysen nicht zur Verfügung stand.

Die dritte unbekanntem Verbindung im Produktgemisch der F601A-SHC (RT = 9,3 min) wird mit einem Produktanteil von 2,2 % zwar in wesentlich größerem Umfang gebildet, doch konnte sie trotzdem für eine Strukturanalyse nicht isoliert werden (C. PALE-GROSDÉMANGE, persönl. Mitteilung). Da sich die RT dieser Verbindung von der des $13\alpha(\text{H})$ -Malabaricatriens um über drei Minuten unterscheidet und zwischen der des 17-Isodammara-20(21),24-diens und des Hopens liegt, dürfte es sich auch in diesem Fall kaum um eine tricyclische Verbindung handeln. Viel wahrscheinlicher liegt hier eine neue tetra- oder pentacyclische Verbindung vor.

Nach HOSHINO *et al.* (1999) entspricht das GC-Chromatogramm ihrer F601A-Mutante dem von MERKOFER *et al.* (1999) publizierten und auch die Mengenangaben über das von dieser Mutante verstärkt gebildete 17-Isodammara-20(21),24-dien (ca. 50% der Hopemenge bzw. ein Produktanteil von 23 %) stimmen mit den hier präsentierten Daten überein. Deshalb ist es unverständlich, wie es zu den Unterschieden bezüglich des Nachweises tricyclischer Verbindungen im Produktgemisch der F601A-SHC kommen kann.

Aus der im Vergleich zur WT-SHC deutlich verstärkten Bildung des 17-Isodammara-20(21),24-dien und der anderen tetracyclischen Produkte geht hervor, daß die Mutation F601A zu einem verstärkten Abbruch der Cyclisierungsreaktion auf der Stufe tetracyclischer Verbindungen führt. Dies belegt, daß die Aminosäure F601 entscheidend an der Bildung des D-Rings bei der Squalen-Cyclisierung beteiligt ist. Da keine Tetracyclen mit einem 6/6/6/6-Ringsystem isoliert wurden und alle tetracyclischen Produkte ausschließlich ein 6/6/6/5-Ringsystem aufweisen, zeigt dies, daß die Cyclisierung des D-Rings

sehr wahrscheinlich zuerst zu einem fünfgliedrigen Ring führt. Ohne Abbruch der Cyclisierungsreaktion erfolgt dann erst in einem zweiten Schritt die Erweiterung zum sechsgliedrigen D-Ring (siehe **Abbildung 44**), an den sich dann noch die Bildung des E-Rings zum 6/6/6/6/5-Pentacyclus des Hopens bzw. Diplopterols anschließt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß F601 im aktiven Zentrum durch π -Kation-Wechselwirkungen das bei einem derartigen Verlauf der Cyclisierungsreaktion vorkommende C-18⁺-Carbokation stabilisiert. Ein Verlust des π -Elektronensystems durch den Austausch F601A führt dann natürlich auch zu einer verminderten Stabilisierung dieses intermediären Carbokations, womit sich der verstärkte Abbruch der Cyclisierungsreaktion und damit die verstärkte Bildung der tetracyclischen Produkte erklärt (MERKOFER *et al.*, 1999).

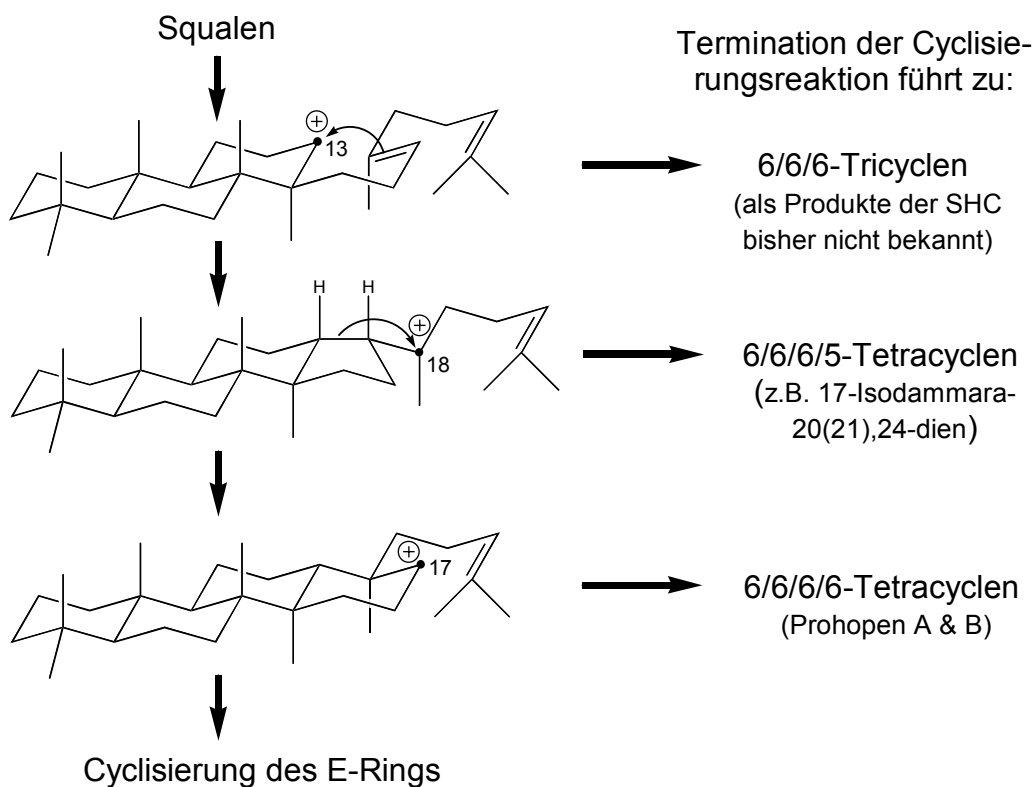


Abbildung 44: Ausschnitt aus der Squalen-Cyclisierung während der Hopfen-Biosynthese mit der Cyclisierung des D-Rings nach der Analyse der Produkte der F601A-SHC-Mutante. Dabei erfolgt zuerst ein Ringschluß zu einem fünfgliedrigen D-Ring mit anschließender Ringerweiterung zum sechsgliedrigen Ring.

Diese Vorstellung wird auch durch die inzwischen vorliegenden Daten zur Funktion der Aminosäure W169 unterstützt, die sich (wie **Abbildung 43** zeigt) im aktiven Zentrum in unmittelbarer Nähe von F601 befindet. Auch dieses Tryptophan ist so ausgerichtet, daß die Ringfläche seiner Seitenkette zum Hohlraum des aktiven Zentrum der SHC weist. Da der Austausch W169F und W169H ebenfalls zu einer verstärkten Bildung des 17-Isodammara-20(21),24-diens führt, scheint auch diese Aminosäure an der Stabilisierung des C-18⁺-

Carbokations beteiligt zu sein. Dabei führt der Ersatz des großen Indolrings durch den kleineren Phenylring durch den Austausch W169F zu eine Reduktion der Enzymaktivität auf nur noch 5,2 % der WT-Aktivität. Ein vollständiger Verlust der aromatischen Funktion durch den Austausch W169H reduziert die Aktivität noch einmal auf 2,2 % (SATO & HOSHINO, 1999a). Der zunehmende Verlust des π -Elektronensystems und damit der Fähigkeit zur Stabilisierung des intermediären C-18⁺-Carbokations führt im Gegenzug zu einer steigenden Menge des produzierten 17-Isodammara-20(21),24-diens: 1,6 % beim WT (siehe **3.3.4**), 5 % bei W169F und 29 % bei W169H (SATO *et al.*, 1998b).

Aufgrund des von HOSHINO *et al.* (1999) beschriebenen Vorkommens der tricyclischen Malabaricatriene im Produktgemisch der F601A-SHC wurde von diesen Autoren auch postuliert, daß F601 nicht nur wie von WENDT *et al.* (1999) angenommen an der Stabilisierung des C-18⁺-Carbokations bei der Bildung des D-Rings beteiligt ist, sondern zusätzlich auch das C-14⁺-Carbokation stabilisiert. Dieses Carbokation entsteht, wenn auch der C-Ring zuerst als fünfgliedriger Ring gebildet wird, bevor eine Ringerweiterung zum sechsgliedrigen Ring führt (siehe **Abbildung 46**; HOSHINO *et al.*, 1999).

Insgesamt ist also festzustellen, daß die erzielten Ergebnisse bei den F601-Mutanten darauf hindeuten, daß die Squalen-Cyclisierung bei der Hopan-Biosynthese nicht in allen Schritten so verläuft, wie sie in **Abbildung 7** gezeigt wurde und deshalb teilweise modifiziert werden muß (siehe **4.7**)

Abschließend muß noch erwähnt werden, daß im Vergleich zu den Mutanten H451A und W489A die F601A-SHC eine deutliche höhere Thermostabilität und mit einem Squalenumsatz von über 90 % bei 50 °C nach 14 Std. auch eine deutlich höhere Enzymaktivität aufweist. Trotz dieser höheren Thermostabilität soll die Mutante nach HOSHINO & SATO (2002) ein deutlich reduziertes Temperaturoptimum von nur 30 – 45 °C besitzen. Zwar wurden im Rahmen dieser Arbeit keine Aktivitätstests bei diesen niedrigen Temperaturen durchgeführt, doch lassen sich die erzielten Daten kaum mit denen von HOSHINO & SATO in Einklang bringen. So beträgt die Aktivität der F601A-SHC bei ihnen nach 1 Stunde bei 30 °C 11,9 %. Wie aus **Abbildung 29** hervorgeht, wurde in der vorliegenden Arbeit bei der gleichen Mutante nach einstündiger Inkubation bei 50 °C dagegen ein geringfügig höherer Umsatz von ca. 15 % festgestellt. Unter Optimalbedingungen sollten natürlich bessere Umsatzraten erzielt werden, als bei einer Inkubationstemperatur, die 20 °C über dem angeblichen Temperaturoptimum dieser Mutante liegt. Das gegenteilige Ergebnis läßt deshalb Zweifel an den Aussagen von HOSHINO & SATO zum Temperaturoptimum dieser Mutanten als angebracht erscheinen.

4.6.4 Y420A-SHC

Als letzte Aminosäure des aktiven Zentrums der SHC wurde Y420 genauer analysiert. Dieses Tyrosin ist innerhalb der Triterpen-Cyclasen nicht konserviert, jedoch kommt bis auf zwei Ausnahmen (*Methanopyrus* und *Allium*) bei allen bekannten Cyclasen an dieser Position immer eine aromatische Aminosäure vor (siehe **Anhang**). Bei den Squalen-Cyclasen besitzen nur die der beiden *Alicyclobacillus*-Arten und *Methanosarcina* dieses Tyrosin. Zusätzlich kommt es bei den Oxidosqualen-Cyclasen bei allen Lanosterol- und Cycloartenol-Cyclasen vor. Bei den meisten anderen SHC ist an dieser Stelle ein Phenylalanin zu finden, während bei *Rhodopirellula* und *Pyrococcus* sowie allen restlichen Oxidosqualen-Cyclasen hier ein Tryptophan vorkommt. Wie die Röntgenstruktur der SHC zeigt, unterscheidet sich die Anordnung der Tyrosine Y420, Y609 und Y612 von der der anderen aromatischen Aminosäuren des aktiven Zentrums. Während diese so ausgerichtet sind, daß die Ringflächen der aromatischen Seitenketten zum aktiven Zentrum weisen, sind die Tyrosine so angeordnet, daß sie mit ihrer Hydroxylgruppe dorthin weisen. Damit erfolgt die Stabilisierung intermediärer Carbokationen natürlich auch nicht mehr mit dem π -Elektronensystem des aromatischen Rings, sondern kann jetzt von den freien Elektronenpaaren der Hydroxylgruppe übernommen werden (WENDT *et al.*, 2000).

Über eine mögliche Funktion von Y420 bei der Cyclisierungsreaktion wurde nach der Aufklärung der Röntgenstruktur der SHC von WENDT zunächst keine Angaben gemacht. Aus der Position dieser Aminosäure im aktiven Zentrum in der Nähe von W489 und oberhalb der von F601 (siehe **Abbildung 30 & 45**) konnte jedoch vermutet werden, daß sie möglicherweise einen Einfluß auf die Cyclisierung des B- und/oder C-Rings hat. Während bei den bisher analysierten SHC-Mutanten der Aminosäureaustausch hauptsächlich zu einem veränderten Mengenverhältnis der auch schon vom WT bekannten Reaktionsprodukte geführt hat, führte die Y420A-Mutation erstmals zu einer SHC, die eine Reihe neuer Verbindungen in zum Teil erheblicher Menge produziert. Insgesamt konnten durch GC-Analysen sieben neue Verbindungen nachgewiesen werden (siehe **Tabelle 6**). Von diesen konnten mit den bicyclischen α - und γ -Polypodatetraen sowie dem tricyclischen 13 α (H)-Malabaricatrien drei Verbindungen eindeutig identifiziert werden. Diese Substanzen waren bisher nur aus verschiedenen Farnen bekannt (SHIOJIMA *et al.*, 1983; MASUDA *et al.*, 1989) und konnten damit erstmals als Produkte der SHC nachgewiesen werden (PALE-GROSDÉMANGE *et al.*, 1999). Mit einem Produktanteil von 8,7 bzw. 5,4 % sind α - und γ -Polypodatetraen nach Hopfen die am meisten gebildeten Produkte dieser Cyclase und übertreffen damit noch die Menge des gebildeten Diplopterols oder des

17-Isodammara-20(21),24-diens. SATO *et al.* (2002) geben dagegen für die beiden bicyclischen Verbindungen mit 16,8 und 6,9 % Produktanteil wesentlich höhere Werte an. Daneben soll die Y420A-SHC auch nur Hopen, Diplopterol und Malabaricatrien produzieren, während das GC-Chromatogramm (siehe **Abbildung 25** und **Tabelle 6**) eindeutig zeigt, daß eine Reihe weiterer Verbindungen im Produktgemisch dieser Cyclase vorkommen. Werden bei der Berechnung des Produktanteils der beiden Polypodatetraene dagegen nur die von SATO *et al.* angegebenen Produkte berücksichtigt, dann führt dies zu höheren Produktanteilen, die mit den von SATO *et al.* genannten Werten vergleichbar sind. Die vier anderen neuen Produkte wurden von PALE-GROSDÉMANGE und ROHMER leider nicht isoliert und identifiziert, obwohl drei dieser Verbindungen mit einem Produktanteil von $\geq 2\%$ in größerer Menge als das identifizierte Malabaricatrien vorlagen.

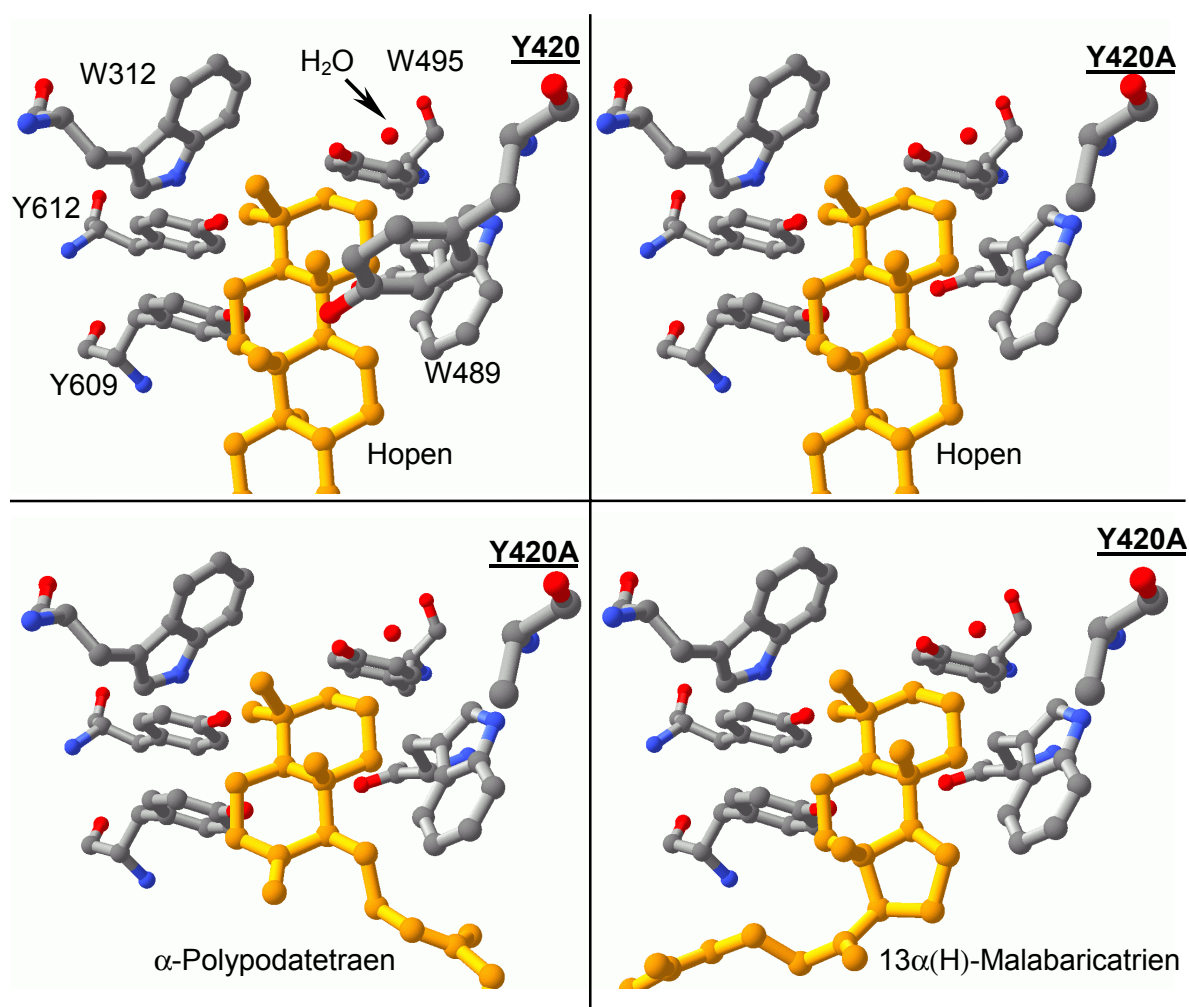


Abbildung 45: Struktur des aktiven Zentrums der SHC beim WT mit einem hineinmodellierten Hopenmolekül [oben links] sowie der Computersimulation der Y420A-Mutation mit Hopen [oben rechts], mit α -Polypodatetraen [unten links] bzw. $13\alpha(H)$ -Malabaricatrien [unten rechts] im aktiven Zentrum. Beim Hopen ist nur ein Teil des D-Rings sichtbar. Für die Struktur der Seitenketten von α -Polypodatetraen und $13\alpha(H)$ -Malabaricatrien gelten die gleichen Einschränkungen wie für das 17-Isodammara-20(21),24-dien in **Abbildung 43**.

Auch für diese Aminosäure liegen inzwischen die Ergebnisse weiterer Mutageneseexperimente vor. So können bei der Y420G-SHC neben Hopen und Diplopterol ebenfalls α - und γ -Polypodatetraen sowie $13\alpha(\text{H})$ -Malabaricatrien nachgewiesen werden, wobei das α -Polypodatetraen in noch größerem Umfang als von der Y420A-Mutante gebildet wird. Auch bei den Mutanten Y420F und Y420D können diese bi- und pentacyclischen Produkte nachgewiesen werden, jedoch entfällt hier die Bildung des tricyclischen Malabaricatriens (FÜLL, 2001a; SATO *et al.*, 2002). Das gleiche gilt für die Mutanten Y420H und Y420W, bei denen dafür mit Neochilla-3,9,17,21-pentaen und 3-Deoxyachilleol zwei monocyclische Triterpene im Produktgemisch nachgewiesen werden konnten (SATO *et al.*, 2002).

Wie die Analyse der Produkte der verschiedenen Y420-Mutanten gezeigt hat, führt ein Austausch dieser Aminosäure zu einer verstärkten Bildung mono-, bi- und tricyclischer Produkte. Demnach beeinflusst Y420 die Bildung des A-, B- und C-Rings. Da von den neuen Nebenprodukten die beiden bicyclischen Polypodatetraene neben Hopen am häufigsten gebildet werden, wirkt sich der Aminosäureaustausch am stärksten auf die Bildung des B-Rings aus. Als wichtigste Funktion von Y420 kann deshalb die Stabilisierung des dabei auftretenden C-8⁺-Carbokations angenommen werden (PALE-GROSDÉMANGE *et al.*, 1999; WENDT *et al.*, 2000; SATO *et al.*, 2002). Wie der Nachweis monocyclischer Produkte zeigt, ist Y420 daneben aber auch an der Stabilisierung des C-10⁺-Carbokations bei der Bildung des A-Rings beteiligt.

Das tricyclische $13\alpha(\text{H})$ -Malabaricatrien weist ein 6/6/5-Ringsystem auf, dagegen konnte ein Produkt mit einem 6/6/6-Ringsystem nicht nachgewiesen werden. Demnach kann – wie für den D-Ring – auch für den C-Ring angenommen werden, daß die Cyclisierung zuerst zu einem fünfgliedrigen Ring führt, der dann in einem weiteren Reaktionsschritt eine Ringerweiterung zum sechsgliedrigen Ring erfährt. Damit scheint Y420 auch an der Stabilisierung des C-14⁺-Carbokations beteiligt zu sein (siehe **Abbildung 46**). Wie schon erwähnt, wurde schon von COREY *et al.* (1995) ein derartiger Verlauf der C-Ringbildung für die Lanosterol-Biosynthese gefordert. Diese Ergebnisse deuten also darauf hin, daß die Squalen-Cyclisierung auch in diesem Schritt von den bisherigen Vorstellungen abweicht, wie sie in **Abbildung 7** gezeigt wurden und entsprechende Modifikationen notwendig macht (siehe **4.7**).

Nimmt man für die Hopen-Biosynthese ein tricyclisches 6/6/5-Zwischenprodukt an, so muß für dieses eine $13\beta(\text{H})$ -Konfiguration gefordert werden (SATO *et al.*, 2002). Das von der Y420A- und Y420G-Mutante gebildete Malabaricatrien weist jedoch eine $13\alpha(\text{H})$ -Konfiguration auf. Dies zeigt, daß durch den Austausch von Y420 gegen die wesentlich

kleineren Aminosäuren Alanin oder Glycin das aktive Zentrum so erweitert wird, daß das Substrat eine andere Faltung einnehmen kann, die dann im Cyclisierungsprodukt zu der veränderten Konfiguration der Seitenkette führt. Ein Austausch von Y420 gegen Aspartat, Histidin, Phenylalanin oder Tryptophan, die alle größere Seitenketten als Alanin oder Glycin aufweisen, führt dagegen zu keiner derartigen Erweiterung des aktiven Zentrums der SHC. Damit wird eine andere Faltung des Squalens unterbunden, weshalb von den Mutanten Y420D, Y420F, Y420H und Y420W auch kein $13\alpha(\text{H})$ -Malabaricatrien gebildet wird (SATO *et al.*, 2002). Damit wird deutlich, daß Y420 nicht nur eine Rolle bei der Stabilisierung intermediärer Carbokationen spielt, sondern auch für die korrekte Faltung des Squalens im aktiven Zentrum verantwortlich ist.

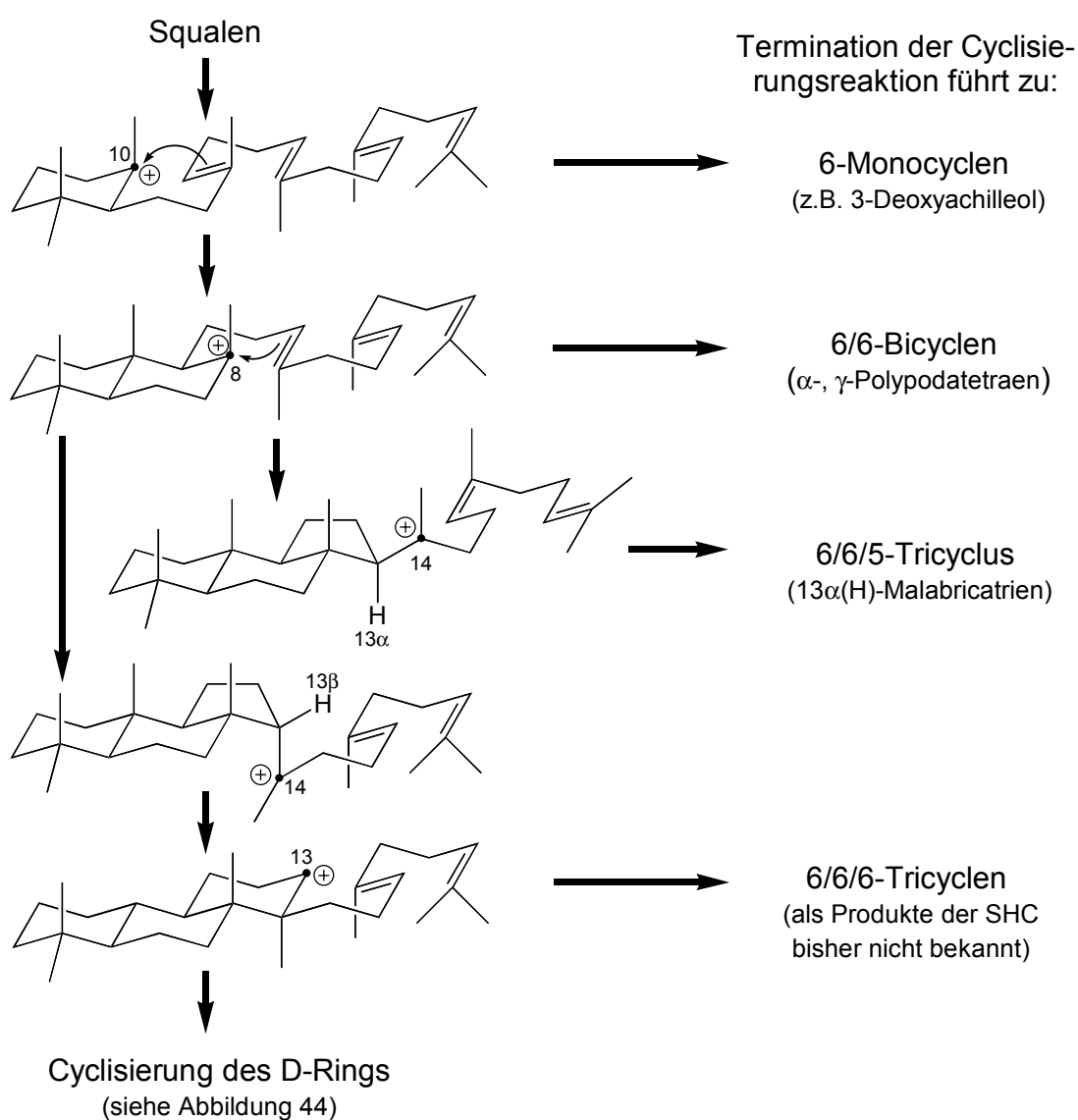


Abbildung 46: Ausschnitt aus der Squalen-Cyclisierung während der Hopfen-Biosynthese mit der Cyclisierung des A-, B- und C-Rings nach der Analyse der Produkte der F420-Mutanten. Während die Cyclisierung des A- und B-Rings gleich zu sechsgliedrigen Cyclen führt, liefert der Ringschluß des C-Rings zuerst einen fünfgliedrigen Ring, auf den dann eine Ringerweiterung folgt. Die weitere Cyclisierung erfolgt dann wie in **Abbildung 44** gezeigt.

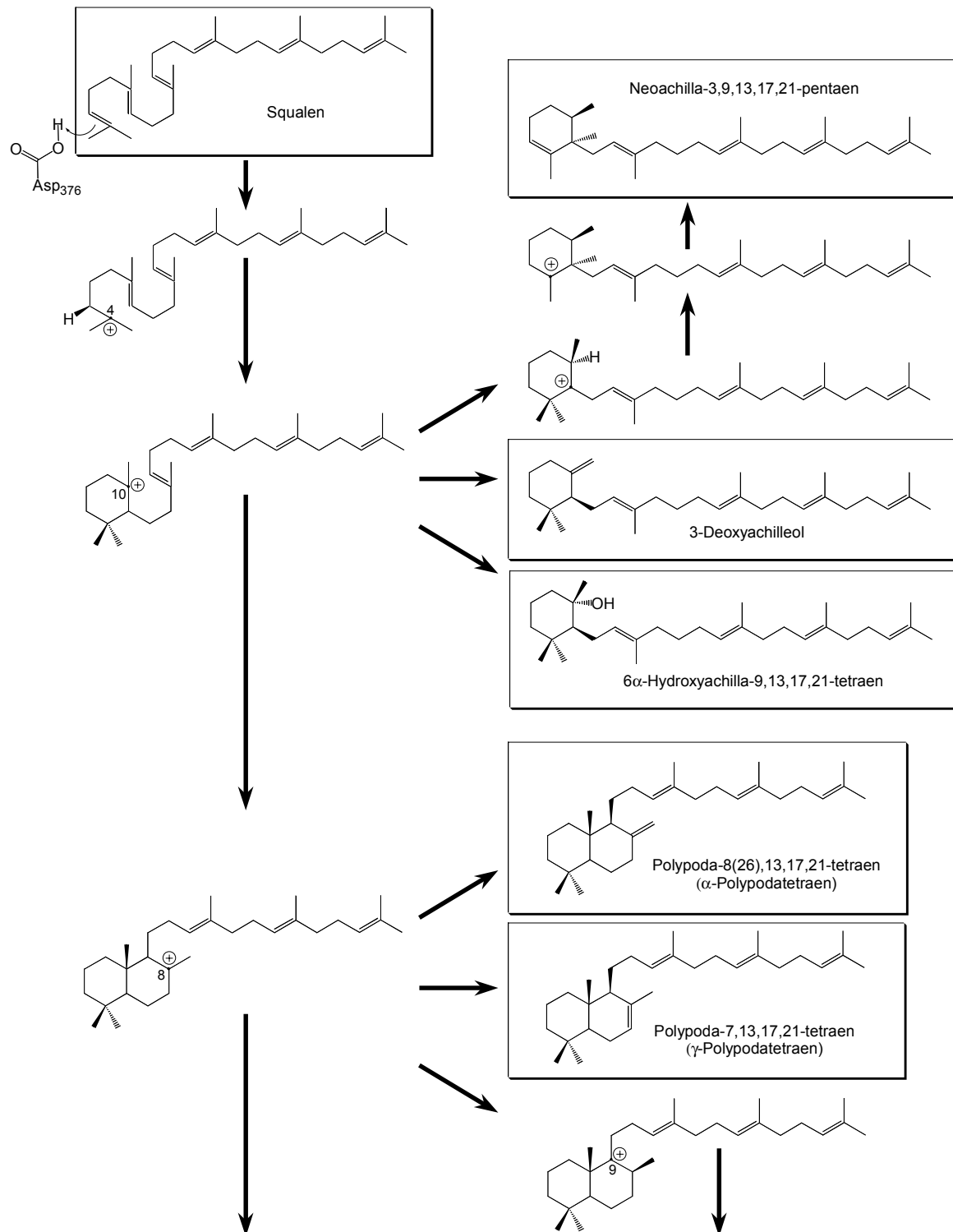
Für die Analyse der Enzymaktivität der SHC-Mutanten wurde bei H451A und W489A durch Anionenaustauschchromatographie angereicherte Cyclase verwendet. Die reduzierte Thermostabilität hat jedoch zu einer im Vergleich zur WT-SHC deutlich höheren Verunreinigung durch andere Proteine geführt. Um den Zeitverlust durch eine Optimierung der Proteinreinigung für jede weitere Mutante zu vermeiden, wurde bei Y420A und F601A auf eine Proteinreinigung ganz verzichtet und für die Aktivitätsbestimmungen Rohextrakte verwendet (siehe 3.3.2 und 3.3.4). Dadurch konnten natürlich keine Angaben zur Enzymkinetik der Mutanten gemacht werden. Der Nachweis verschiedener neuer Cyclisierungsprodukte zeigt jedoch, daß trotz dieser Einschränkung eine Reihe interessanter Erkenntnisse erzielt werden konnten, die insgesamt zu einem besseren Verständnis des Cyclisierungsmechanismus der SHC beigetragen haben.

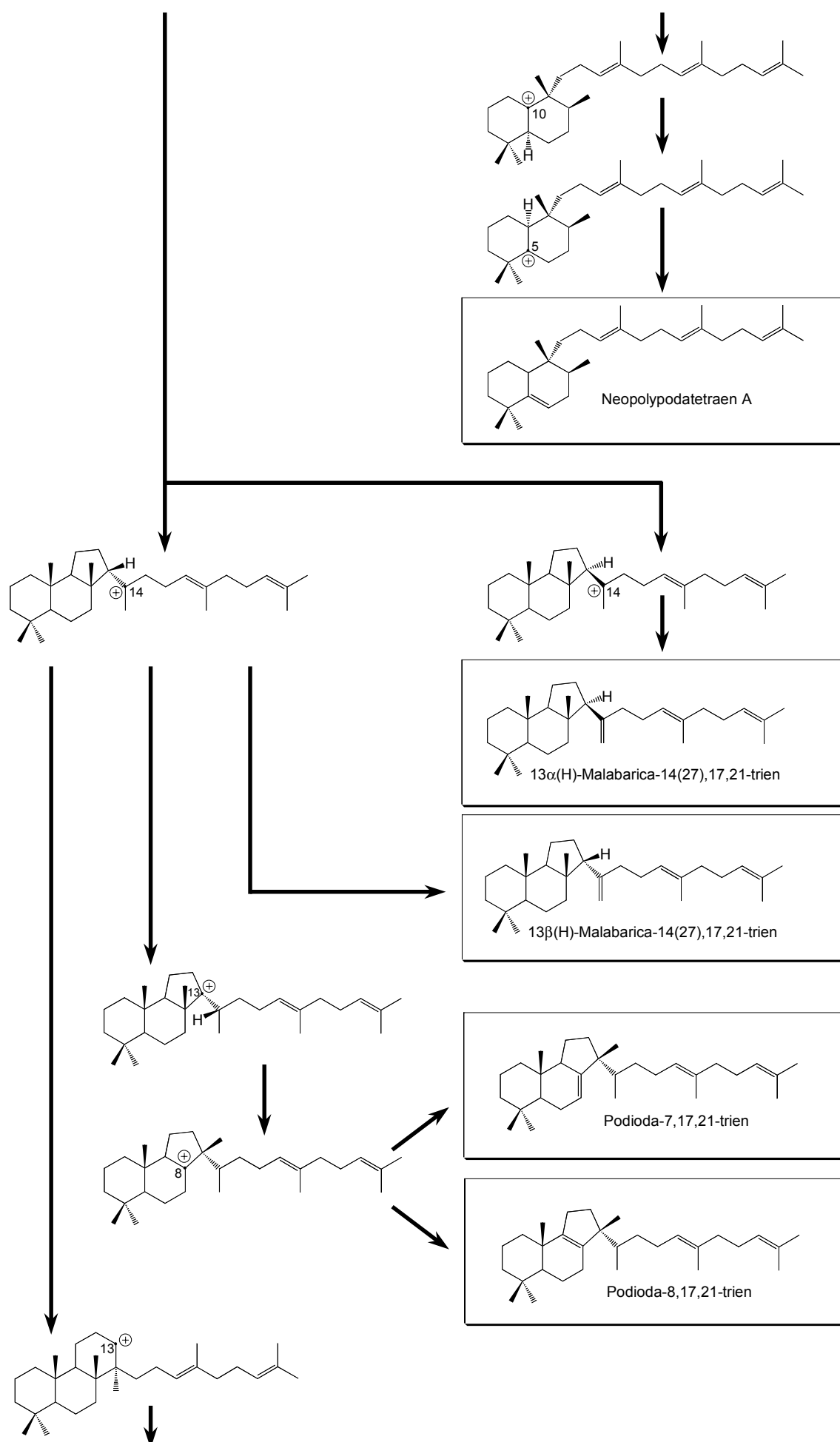
4.7 Neues Modell für den Reaktionsmechanismus der SHC und Ausblick

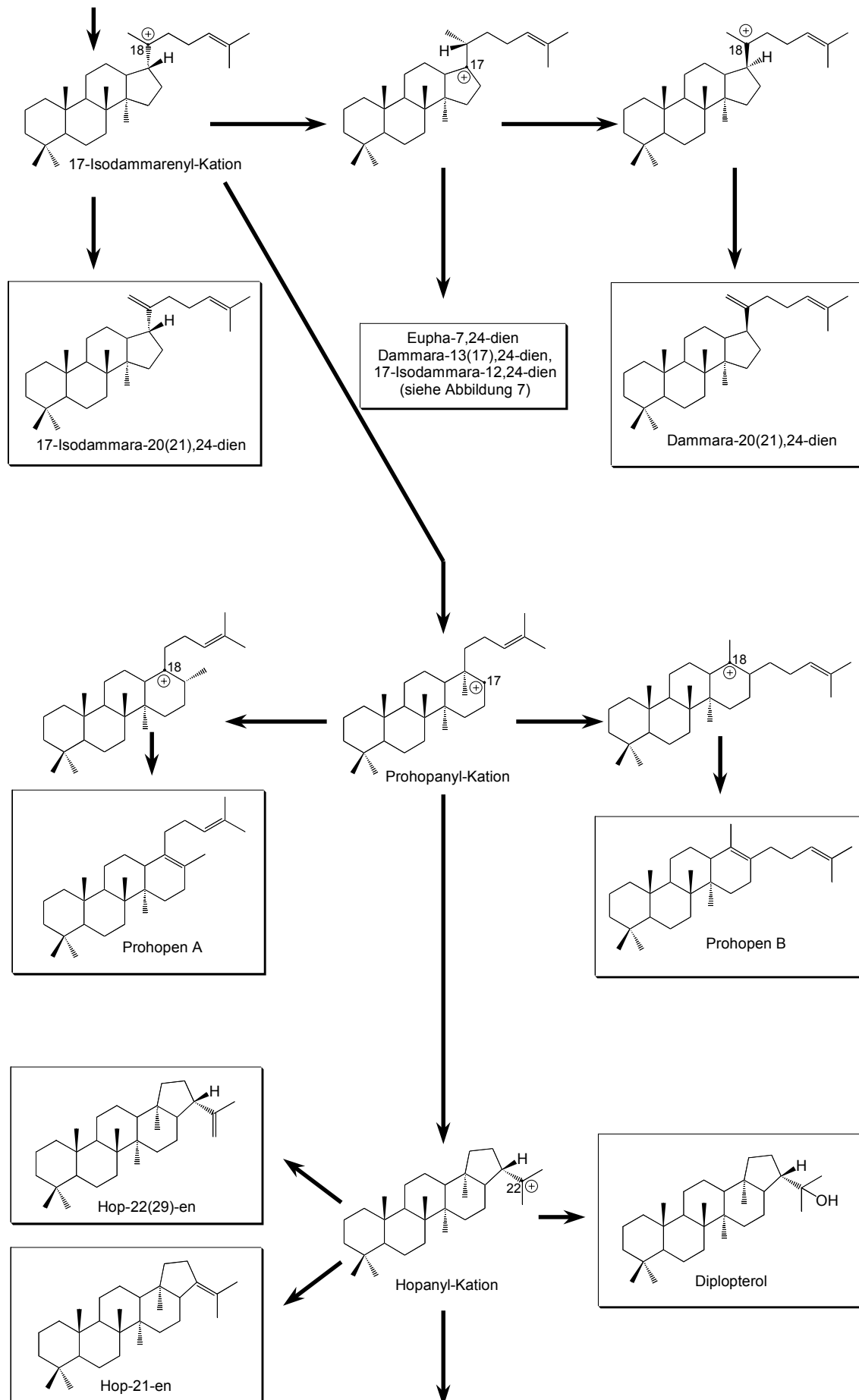
Bisher waren mit den bekannten tetra- und pentacyclischen Verbindungen (PALE-GROSDÉMANGE *et al.*, 1998) nur Produkte der letzten Reaktionsschritte der Squalen-Cyclisierung bekannt. Neben den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen bi- und tricyclischen Produkten der SHC wurden bei anderen Mutanten weiteren neue Verbindungen nachgewiesen, zu denen verschiedene Monocyclen (SATO & Hoshino, 1999b; SATO *et al.*, 2002), tricyclische Podiodatriene (HOSHINO & SATO, 1999; HOSHINO *et al.*, 2000b; SATO & HOSHINO, 2001) und Prohopene mit einem tetracyclischen 6/6/6/6-Ringsystem (HOSHINO *et al.*, 2000a) gehören. Damit liegen jetzt auch Hinweise für die frühen Zwischenstufen der Squalen-Cyclisierung vor. Wie schon erwähnt, deutet zudem der Nachweis von 6/6/5- statt 6/6/6-Tricyclen und 6/6/6/5- statt 6/6/6/6-Tetracyclen im Produktgemisch der SHC-Mutanten darauf hin, daß die Cyclisierung des C- und D-Rings entgegen der bisherigen Vorstellungen zuerst zu fünfgliedrigen Ringen führt, die danach zu sechsgliedrigen Ringen erweitert werden. Nach all diesen Ergebnissen kann der Verlauf der Squalen-Cyclisierung jetzt in den folgenden acht Reaktionsschritten unterteilt werden:

1. Protonierung der terminalen Squalendoppelbindung und 1. Cyclisierung des A-Rings.
2. Zweite Cyclisierung des B-Rings → 6/6-Bicyclus
3. Dritte Cyclisierung des C-Rings → 6/6/5-Tricyclus
4. Erste Ringerweiterung zum 6/6/6-Tricyclus
5. Vierte Cyclisierung des D-Rings → 6/6/6/5-Tetracyclus (17-Isodammarenyl-Kation)
6. Zweite Ringerweiterung zum 6/6/6/6-Tetracyclus (Prohopanyl-Kation)
7. Fünfte Cyclisierung des E-Rings → 6/6/6/6/5-Pentacyclus (Hopanyl-Kation)
8. Termination durch Deprotonierung → Hopen

Damit muß die in **Abbildung 7** gezeigte Vorstellung über den Ablauf der Squalen-Cyclisierung teilweise modifiziert bzw. in anderen Teilen erheblich erweitert werden. Diese überarbeitete Version verdeutlicht den in den letzten Jahren erreichten Fortschritt beim Verständnis des Reaktionsmechanismus der SHC (siehe **Abbildung 47**).







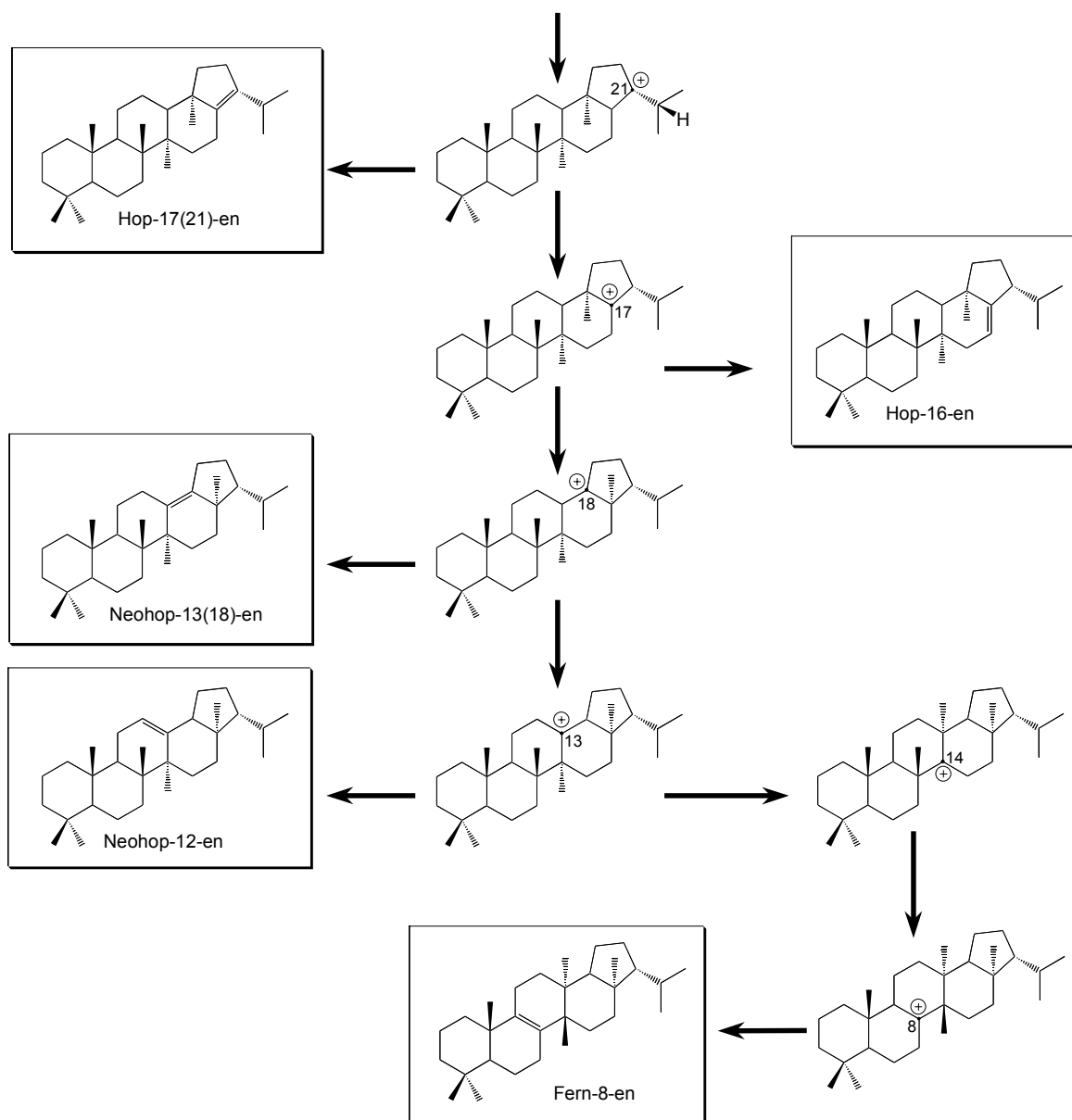


Abbildung 47: Reaktionsmechanismus der Squalen-Cyclisierung durch die Squalen-Hopen-Cyclase. Bis auf Fern-8-en, ein Produkt der SHC von *Zymomonas mobilis* (DOUKA *et al.*, 2001), werden alle anderen Produkte vom Wildtyp oder einer der Mutanten der SHC von *Alicyclobacillus acidocaldarius* produziert, die in dieser Arbeit vorgestellt wurden oder in der Arbeitsgruppe von T. HOSHINO (Niigata University, Japan) konstruiert wurden. Die Positionen der intermediären Carbokationen sind unter Verwendung der Atomnumerierung im Hopenmolekül angegeben. Protonen sind zwecks besser Übersichtlichkeit nur bei einigen Reaktionsschritten mit Hydridverschiebungen angezeigt. Ebenfalls ist die inzwischen bekannte Termination auf der Stufe des 17-Isodammarenylkations durch OH^- Anlagerung nicht gezeigt, die zum 21-Hydroxy-17-isodammara-24-en führt.

Von den in **Abbildung 47** gezeigten Produkten der Squalen-Cyclisierung können die erstmals bei der Y420A-Mutante identifizierten Verbindungen α - und γ -Polypodatetraen sowie $13\alpha(\text{H})$ -Malabaricatrien durch GC- und GC/MS-Analysen auch in sehr geringer Menge im Produktgemisch der WT-SHC von *Alicyclobacillus acidocaldarius* nachgewiesen werden (siehe 3.3.4). Zusammen mit den von PALE-GROSDÉMANGE *et al.* (1998) charakte-

risierten Verbindungen sind damit aber noch immer nicht alle Produkte dieses Enzyms bekannt, da sich im Produktgemisch der WT-SHC mehr als ein Dutzend Squalenderivate massenspektrometrisch nachweisen lassen (FEIL, 1997). Von den anderen Verbindungen in **Abbildung 47** sind Hop-21-en, Hop-17(21)-en, Neohop-12-en und Fern-8-en bekannte Produkte der WT-SHC von *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 (DOUKA *et al.*, 2001). Aus diesem Grund ist es sehr wahrscheinlich, daß noch andere der bisher nicht charakterisierten Produkte der WT-SHC von *A. acidocaldarius* mit den in **Abbildung 47** gezeigten Verbindungen identisch sind. Diese Befunde deuten darauf hin, daß sich die bei den verschiedenen SHC-Mutanten gefundenen Produkte von Intermediaten der normalen Squalen-Cyclisierungsreaktion ableiten lassen, die durch einen mutationsbedingten vorzeitigen Reaktionsabbruch entstehen. Sie sind damit sicher keine Artefakte einer durch diese Mutationen völlig entarteten Cyclisierungsreaktion und erlauben deshalb Rückschlüsse auf den natürlichen Reaktionsmechanismus dieser Cyclase.

Bei der bisherigen Vorstellung des Reaktionsmechanismus der SHC war die Cyclisierung des C- und D-Rings erklärungsbedürftig, da beide in Form einer Anti-Markovnikov-Addition erfolgen, die im Gegensatz zu den anderen Cyclisierungsschritten zu thermodynamisch ungünstigeren sekundären Kationen führt (siehe **Abbildung 7**). Eine Cyclisierungsreaktion, die dagegen über fünfgliedrige Zwischenstufen verläuft, vermeidet dieses Problem, da dann in beiden Fällen der Ringschluß zu den thermodynamisch günstigeren tertiären Carbokationen C-14⁺ (C-Ring) und C-18⁺ (D-Ring) führt. Auch dies spricht dafür, daß der in **Abbildung 47** gezeigte Reaktionsmechanismus die tatsächlichen Gegebenheiten widerspiegelt.

Für einen solchen Reaktionsmechanismus spricht auch der Befund, daß von den verschiedenen bekannten Squalenderivaten vor allem das 17-Isodammara-20(21),24-dien von vielen SHC-Mutanten verstärkt produziert wird (diese Arbeit; SATO *et al.*, 1998b; HOSHINO *et al.*, 1999; HOSHINO *et al.*, 2000b; FÜLL & PORALLA, 2000; SCHMITZ *et al.*, 2001). Da nach dem modifizierten Reaktionsmechanismus das 17-Isodammarenyl-Kation ein zentrales Zwischenprodukt der Cyclisierungsreaktion ist, wird leicht klar, warum eine Termination durch Deprotonierung auf der Stufe dieses intermediären Kations zu der verstärkten Bildung von 17-Isodammara-20(21),24-dien führt. Im Gegensatz dazu ist nach der bisherigen Vorstellung das 17-Isodammara-20(21),24-dien nur das Endprodukt einer Nebenreaktion, die nach der Bildung eines 6/6/6-Tricycluses vom normalen Reaktionsweg abzweigt (siehe **Abbildung 7**) und es bleibt offen, warum die verschiedenen Mutationen ausgerechnet diese Nebenreaktion derartig begünstigen sollten.

Bisher sind ausschließlich monocyclische (6α -Hydroxyachillatetraen; SATO *et al.*, 2002), tetracyclische (21-Hydroxy-17-isodammar-24-en; HOSHINO *et al.*, 2000b; in **Abbildung 47** nicht gezeigt) oder pentacyclische (Diplopterol) hydroxylierte Cyclisierungsprodukte der SHC bekannt, während hydroxylierte Bi- und Tricyclen unbekannt sind. Dies bedeutet, daß ein Abbruch der Cyclisierungsreaktion durch Wassermoleküle nur im oberen und unteren Bereich des aktiven Zentrums möglich ist, wo in der Kristallstruktur auch tatsächlich Wassermoleküle gefunden wurden. Im zentralen Bereich des aktiven Zentrums, wo die Cyclisierung des B- und C-Rings stattfinden, wird der Wasserzutritt dagegen durch die zahlreichen hydrophoben Aminosäuren verhindert, die damit die intermediären Carbokationen stabilisieren und einen Abbruch der Cyclisierung verhindern (DOUGHERTY, 1996; WENDT *et al.*, 1997; WENDT *et al.*, 2000).

Bei keiner der SHC-Mutanten führt ein Aminosäureaustausch zu einem vollständigen Abbruch der Cyclisierungsreaktion auf der Stufe mono-, bi-, tri- oder tetracyclischer Verbindungen. Demnach ist keine Aminosäure des aktiven Zentrums ausschließlich für die Stabilisierung eines der intermediären Carbokationen verantwortlich, sondern diese Aufgabe wird immer von mehreren übernommen und somit kann der Ausfall einer Aminosäuren häufig kompensiert werden. Da die bisherigen Ergebnisse mit Doppel- und Mehrfachmutanten keinem einheitlichen Schema folgen (SCHMITZ, 2000; FÜLL, 2001a), erscheint es fraglich, ob damit die Interaktionen dieser Aminosäuren aufgeklärt werden können.

In den letzten Jahren haben mehrere Arbeitsgruppen versucht, den Verlauf der Squalen-Cyclisierung durch verschiedene Computersimulationen aufzuklären. Die dabei erzielten Ergebnisse stehen zum Teil im deutlichen Widerspruch zu der oben beschriebenen Interpretation der Ergebnisse der Mutagenesestudien, weshalb von diesen Autoren auch ein von **Abbildung 47** abweichender Verlauf der Cyclisierungsreaktion angenommen wird. Nach den Berechnungen von RAJAMANI & GAO (2003) erfolgt die Squalen-Protonierung und die Bildung des A-Rings konzertiert. Der nächste Cyclisierungsschritt zum B-Ring erfordert nur eine geringe Aktivierungsenergie von $3,9 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1}$, weshalb diese Cyclisierung schnell erfolgt. Das monocyclische Intermediat hat deshalb nur eine kurze Lebensdauer, was auch die geringe Konzentration der bisher bekannten monocyclischen Endprodukte erklärt. Vom bicyclischen C-8⁺-Kation sind dann drei Folgereaktionen mögliche, die direkt zu 6/6/5- bzw. 6/6/6/5- bzw. 6/6/6/6/5-cyclischen Endprodukten führen. Ohne Ringerweiterungsschritte sollen tetra- und pentacyclische Produkte demnach durch konzertierte Cyclisierungen des C- und D-Rings bzw. des C-, D- und E-Rings entstehen. Durch eine etwas geringere Aktivierungsenergieschwelle ist die Bildung pentacyclischer Endprodukte ge-

genüber tetracyclischen Produkte begünstigt. Nach RAJAMANI & GAO sind 6/6/6/5-Tetracyclen auch keine Vorstufen der pentacyclischen Endprodukte, da diese Umwandlung nach ihren Berechnungen eine Aktivierungsenergie von $27,8 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1}$ erfordert, während sie bei der direkten Umwandlung des 6/6-Zwischenprodukts zum 6/6/6/6/5-Endprodukt mit $9,1 \text{ kcal} \times \text{mol}^{-1}$ dreimal kleiner ist.

Zu ganz anderen Ergebnissen als RAJAMANI & GAO kommen dagegen HESS *et al.*. Demnach erfolgt die Cyclisierung des A- und des B-Rings in einer konzertierten Reaktion ohne monocyclisches Zwischenprodukt (HESS, 2004; HESS & SMENTEK, 2004). Bei der Lanosterol-Cyclase soll zusätzlich noch der C-Ring in dieser konzertierten Reaktion gebildet werden (HESS, 2003). Die durch Kristallisation aufgeklärte Struktur des aktiven Zentrums der SHC mit dem Squalenalanalogon 2-Azasqualen (REINERT *et al.*, 2004) soll ebenfalls auf eine derartige konzertierte Cyclisierung von A- und B-Ring hindeuten. Die unterschiedlichen und zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse dieser verschiedenen Computersimulationen, die nur schwer mit den Ergebnissen der Mutageneseexperimenten in Übereinstimmung zu bringen sind, lassen es fragwürdig erscheinen, ob die bisher verwendeten mathematischen Modelle für eine vollständigen Erklärung der Cyclisierungsreaktion geeignet sind.

In den letzten Jahren sind nahezu alle Aminosäuren des aktiven Zentrums mutiert worden, die die Cyclisierungsreaktion von der Initiation bis zum letzten Cyclisierungsschritt beeinflussen können. Zuletzt wurden noch die Aminosäuren näher analysiert, die für die Termination durch Deprotonierung der Z-Methyl-Gruppe an der terminalen Doppelbindung des Substrats verantwortlich sind (SATO *et al.*, 2004; HOSHINO *et al.*, 2004a). Auch wurde die Substratspezifität der SHC mit verschiedenen Substraten getestet (HOSHINO *et al.*, 2004b; NAKANO *et al.*, 2004) und die Auswirkungen von Mutationen bei Aminosäuren des Kanals von der Enzymoberfläche ins aktive Zentrum analysiert (SATO *et al.*, 2004). Dies dürfte dazu führen, daß in absehbarer Zeit der Reaktionsmechanismus dieses Enzyms vollständig aufgeklärt sein wird. Weiter unklar ist jedoch noch immer, wie die Freisetzung der Cyclisierungsprodukte aus dem aktiven Zentrum der SHC erfolgt.

Nach der Freisetzung aus dem aktiven Zentrum der Cyclase wird die Seitenkette des Hopens noch verlängert und modifiziert (siehe **Abbildung 1**). Genauere Details dieser Reaktionsschritte sind jedoch noch weitestgehend unbekannt, da keines der an diesen Reaktionen beteiligten Enzyme bisher isoliert und näher charakterisiert wurde. Inzwischen ist jedoch von einigen Prokaryoten bekannt, daß bei ihnen das SHC-Gen in einem Operon zusammen mit anderen Genen vorkommt, die möglicherweise für den weiteren Hopens-

Metabolismus verantwortlich sind. Während die bei *Bradyrhizobium japonicum* (PERZL, 1996; PERZL *et al.*, 1997, 1998) und bei *Methylococcus capsulatus* (TIPPELT, 1997; TIPPELT *et al.*, 1998) entdeckten Hopanoid-Operons nur wenige Gene umfassen, konnte bei der Genomsequenzierung von *Streptomyces coelicolor* ein wesentlich größeres Operon entdeckt werden, das aus 13 offenen Leserastern besteht. Bei einigen dieser Sequenzen kann aufgrund von Sequenzähnlichkeiten mit schon bekannten Enzymen eine Funktion im Isoprenoid- und Hopanoid-Metabolismus angenommen werden kann (PORALLA *et al.*, 2000). Für eine vollständige Klärung dieses Hopanoid-Stoffwechsels müssen jedoch noch zahlreiche Details geklärt werden. Es kann jedoch damit gerechnet werden, daß auch die ständig zunehmende Zahl vollständig bekannter prokaryotischer Genome zu neuen Erkenntnisse über die Regulation der SHC und ihre Einbindung in den bakteriellen (Triterpen-) Stoffwechsel führt und somit ein besseres Verständnis des Hopanoid-Metabolismus ermöglichen wird.

5. Zusammenfassung

Die Squalen-Hopen-Cyclase (SHC) von *Alicyclobacillus acidocaldarius* katalysiert mit der Cyclisierung des linearen Squalens zum pentacyclischen Hopen eine der komplexesten Einzschrittreaktionen, die bisher bekannt sind. Obwohl diese SHC die am besten untersuchte Triterpen-Cyclase darstellt, sind bisher noch viele Details des Reaktionsmechanismus ungeklärt. Die vorliegende Arbeit sollte molekularbiologische Erkenntnisse über die SHC liefern, die ein besseres Verständnis der Funktion dieses Enzyms ermöglichen.

Zu Beginn der Arbeit konnte durch eine teilweise Neusequenzierung des SHC-Gens ein Fehler der bisherigen Aminosäuresequenz korrigiert werden. Durch diese Sequenzkorrekturen weist die SHC im N-terminalen Bereich eine vollständig veränderte Sequenz von 163 Aminosäuren auf, die jetzt mit der von anderen Squalen-Cyclasen besser übereinstimmt. Die neue Sequenz konnte auch durch die N-terminale Ansequenzierung eines Proteinfragments der SHC nach tryptischen Verdau bestätigt werden.

Die korrigierte Sequenz wurde in einem Alignment mit nahezu allen gegenwärtig bekannten pro- und eukaryotischen Triterpen-Cyclasen verglichen, was interessante Einblicke in die Evolution dieser Enzyme ermöglicht. Verschiedene Aspekte wie Entwicklungen der SHC in der Evolution unterschiedlicher Bakteriengruppen sowie Trends bei der Evolution der verschiedenen Oxidosqualen-Cyclasen aus ihren prokaryotischen SHC-Vorläufern wurden analysiert und diskutiert.

Eine von verschiedenen Autoren postulierte Dimerbildung der SHC konnte durch Molekulargewichtsbestimmung mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie bzw. FPLC nicht bestätigt werden. Damit bleibt ungeklärt, ob *in vitro* (und damit auch *in vivo*) die SHC als Dimer vorliegt und ob diese Dimerisierung gegebenenfalls von Bedeutung für die Enzymaktivität ist.

Von den N- und C-terminalen Deletionsmutanten zur Bestimmung der minimalen aktiven Enzymgröße konnte nur die DelN1-Mutante mit der Deletion der ersten sechs Aminosäuren erfolgreich getestet werden, die sich jedoch kaum von der Aktivität des WT-Enzyms unterschied. Der Mißerfolg bei größeren Deletionen sowie Erkenntnisse aus der Röntgenstrukturanalyse der SHC deuten darauf hin, daß bei der SHC kaum terminale Aminosäuren deletiert werden können, da diese Bestandteil von Proteinsekundärstrukturen sind, die für die Stabilität des Enzyms von Bedeutung sind.

Die erfolgreiche Aufklärung der Röntgenstruktur der SHC (WENDT *et al.*, 1997) ermöglichte schließlich die gezielte Mutagenese von Aminosäuren des aktiven Zentrums, wobei

ausgewählte Aminosäuren durch Alanin ersetzt wurden. Die Analyse der durch die Mutation veränderten Reaktionsprodukte ermöglichte Rückschlüsse auf die Funktion dieser Aminosäuren für den Cyclisierungsmechanismus.

H451: Die postulierte Unterstützung von D376 durch H451 bei der Squalen-Protonierung und damit der Initiation der Cyclisierungsreaktion konnte durch die deutliche Reduktion der Enzymaktivität der H451A-Mutation belegt werden. Die Restaktivität dieser Mutante belegt jedoch auch, daß H451 nicht essentiell für die SHC-Aktivität ist.

W489: Die deutliche Reduktion der Enzymaktivität durch diese Mutation ist ein Hinweis auf die Bedeutung dieser Aminosäure für die Enzymaktivität, die zu den am stärksten konservierten Aminosäuren der bisher bekannten Triterpen-Cyclasen gehört. Die postulierte Stabilisierung des C-10⁺-Carbokations bei der Bildung des A-Rings konnte jedoch nicht belegt werden, da keine monocyclischen Abbruchprodukte nachgewiesen werden konnten. Die genaue Funktion von W489 bei der Cyclisierungsreaktion bleibt damit ungeklärt.

F601: Mit der F601A-SHC wurde erstmals bei einer SHC-Mutante eine deutliche Veränderung des Produktspektrums erreicht. Das nach Hopen zweithäufigste Produkt dieser Cyclase konnte als 17-Isodammara-20(21),24-dien identifiziert werden. Die im Vergleich zum WT bei dieser Mutante um das 17,5-fache verstärkte Produktion dieser tetracyclischen Verbindung belegt die Stabilisierungsfunktion dieser Aminosäure für das C-18⁺-Carbokation bei der Bildung des D-Rings.

Y420: Mit der Y420A-Mutation wurde erstmals bei einer SHC die Bildung neuer Produkte in erheblichen Umfang erreicht. Davon konnten die beiden bicyclischen Verbindungen α - und γ -Polypodatetraen sowie das tricyclische 13 α (H)-Malabaricatrien identifiziert werden. Alle drei Verbindungen sind bisher nur aus Farnen, nicht jedoch aus Bakterien bekannt gewesen. Nach den schon länger bekannten tetracyclischen Nebenprodukten der SHC konnten damit erstmals auch Belege für frühere Reaktionsschritte der Squalen-Cyclisierung gefunden werden. Diese Produkte belegen die Bedeutung von Y420 für die Stabilisierung des C-8⁺- und C-14⁺-Carbokations bei der Bildung des B- und C-Rings.

Die 6/6/5-Ringstruktur des 13 α (H)-Malabaricatriens und die 6/6/6/5-Ringstruktur des 17-Isodammara-20(21),24-diens deuten darauf hin, daß die Cyclisierung zum C- bzw. D-Ring zuerst zu fünfgliedrigen Intermediaten führt, die dann in einem zweiten Reaktionsschritt zu sechsgliedrigen Ringen erweitert werden. Die Ergebnisse ermöglichen deshalb eine Modifikation der bisherigen Vorstellungen über den Ablauf der Cyclisierungsreaktion durch die Squalen-Hopen-Cyclase von *Alicyclobacillus acidocaldarius*.

6. Anhang

Für das Alignment der pro- und eukaryotischen Triterpen-Cyclasen wurden die bis Ende 2003 verfügbaren Sequenzen aus den nachfolgend aufgelisteten Organismen verwendet. Im Alignment (siehe unten) sowie im Dendrogramm (siehe **Abbildung 34**) sind die einzelnen Sequenzen unter der vor dem jeweiligen Organismenname aufgeführten Nummer zu finden. Bei den in der GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/index.html>) hinterlegten Sequenzen ist die dazugehörige GenBank Accession Nummer angegeben. Die Sequenzen [33, 34] stammen dagegen aus der TIGR-Datenbank (<http://www.tigr.org>). Zusätzlich sind bei allen Sequenzen die Anzahl der Aminosäuren und Literaturangaben (so weit vorhanden) aufgeführt. Die Zuordnung einer Sequenz zu einer der verschiedenen Gruppen von Triterpen-Cyclasen erfolgte in der Regel nach den entsprechenden Angaben des jeweiligen Datenbankeintrags. In einigen Fällen wurde für die Zuordnung die Position der betroffenen Sequenz im Dendrogramm (siehe **Abbildung 34**) verwendet.

Mit Zahlen über dem Alignment sind zur besseren Orientierung die Aminosäure-Positionen in der Sequenz von *Alicyclobacillus acidocaldarius* [01] angegeben. Zusätzlich sind dort auch die Positionen der im Rahmen dieser Arbeit mutierten Aminosäuren des aktiven Zentrums dieser Cyclase (gelb), die QW-Motive (blau) sowie das aspartatreiche Sequenzmotiv (grün) markiert. Bei letzterem ist die Konsensussequenz der Squalen-Hopen-Cyclasen angegeben.

Squalen-Hopen-Cyclasen:

- [01]: *Alicyclobacillus acidocaldarius* (P33247 / 631 / OCHS, 1990, OCHS *et al.*, 1992)
- [02]: *Alicyclobacillus acidoterrestris* (S58163 / 634 / CHOI, 1995)
- [03]: *Streptomyces coelicolor* A3 (2) (NP_630836 / 680 / BENTLEY *et al.*, 2002)
- [04]: *Streptomyces avermitilis* MA-4680 (NP_822826 / 666 / IKEDA *et al.*, 2003)
- [05]: *Nostoc (Anabaena) sp.* PCC 7120 (NP_484818 / 637 / KANEKO *et al.*, 2001)
- [06]: *Nostoc punctiforme* (ZP_00108569 / 638 / —)
- [07]: *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (NP_683099 / 642 / NAKAMURA *et al.*, 2002)
- [08]: *Trichodesmium erythraeum* IMS 101 (ZP_00071472 / 632 / —)
- [09]: *Gloeobacter violaceus* PCC 7421 (NP_927003 / 637 / NAKAMURA *et al.*, 2003)
- [10]: *Synechocystis sp.* PCC 6803 (NP_441298 / 647 / KANEKO *et al.*, 1996)
- [11]: *Bacillus subtilis subtilis* 168 (CAB18324 / 632 / KUNST *et al.*, 1997)
- [12]: *Bacillus anthracis* Ames (NP_845882 / 617 / READ *et al.*, 2003)
- [13]: *Bacillus cereus* ATCC 14579 (NP_833290 / 617 / IVANOVA *et al.*, 2003)
- [14]: *Bradyrhizobium japonicum* (CAA60250 / 660 / PERZL, 1996, PERZL *et al.*, 1997)
- [15]: *Rhodopseudomonas palustris* (CAA71101 / 654 / RAHN, 1996)
- [16]: *Rhizobium sp.* NGR 234 (NP_443761 / 647 / FREIBERG *et al.*, 1997)
- [17]: *Magnetospirillum magnetotacticum* (ZP_00052068 / 693 / —)
- [18]: *Burkholderia fungorum* (ZP_00030945 / 678 / —)
- [19]: *Ralstonia metallidurans* (ZP_00021187 / 669 / —)
- [20]: *Zymomonas mobilis* (S37494 / 658 / REIPEN *et al.*, 1995)

- [21]: *Rhodospirillum rubrum* (ZP_00013064 / 660 / —)
 [22]: *Nitrosomonas europaea* ATCC 19718 (NP_841225 / 666 / CHAIN *et al.*, 2003)
 [23]: *Methylococcus capsulatus* Bath (T45142 / 654 / TIPPELT, 1997, TIPPELT *et al.*, 1998)
 [24]: *Azotobacter vinelandii* (ZP_00089879 / 664 / —)
 [25]: *Geobacter metallireducens* (ZP_00080501 / 730 / —)
 [26]: *Geobacter sulfurreducens* PCA (NP_954103 / 730 / METHE *et al.*, 2003)
 [27]: *Desulfitobacterium hafniense* (ZP_00098597 / 529 / —)
 [28]: *Rhodopirellula baltica* (= *Pirellula* sp. 1 / NP_866975 / 661 / GLÖCKNER *et al.*, 2003)
 [29]: *Methanosarcina acetivorans* C2A (NP_618075 / 412 / GALAGAN *et al.*, 2002)
 [30]: *Pyrococcus abyssi* (CAB49729 / 690 / COHEN *et al.*, 2003)
 [31]: *Methanopyrus kandleri* AV19 (NP_614816 / 558 / SLESAREV *et al.*, 2002)
 [32]: *Magnaporthe grisea* 70-15 (EAA49134 / 683 / —)

Oxidosqualen-Lanosterol-Cyclasen:

- [33]: *Gemmata obscuriglobus* (— / 642 / PEARSON *et al.*, 2003)
 [34]: *Methylococcus capsulatus* Bath (— / 642 / PEARSON *et al.*, 2003)
 [35]: *Trypanosoma brucei brucei* (AAG26328 / 905 / BUCKNER *et al.*, 2000)
 [36]: *Trypanosoma cruzi* (AAK82995 / 858 / JOUBERT *et al.*, 2001)
 [37]: *Saccharomyces cerevisiae* (P38604 / 731 / COREY *et al.*, 1994)
 [38]: *Candida albicans* (Q04782 / 728 / BUNTEL & GRIFFIN, 1992)
 [39]: *Schizosaccharomyces pombe* (Q10231 / 721 / COREY *et al.*, 1996)
 [40]: *Pneumocystis carinii* (AAK82993 / 719 / MILLA *et al.*, 2002a)
 [41]: *Neurospora crassa* (XP_326612 / 753 / GALAGAN *et al.* 2003)
 [42]: *Cephalosporium caerulens* (AAL56020 / 760 / ABE *et al.*, 2001)
 [43]: *Mus musculus* (AAH29082 / 733 / STRAUSBERG *et al.*, 2002)
 [44]: *Rattus norvegicus* (P48450 / 733 / KUSANO *et al.*, 1995; ABE & PRESTWICH, 1995)
 [45]: *Homo sapiens* (P48449 / 732 / BAKER *et al.*, 1995; SUNG *et al.*, 1995)

Oxidosqualen-Cycloartenol-Cyclasen:

- [46]: *Stigmatella aurantiaca* (CAD39196 / 597 / BODE *et al.*, 2003)
 [47]: *Dictyostelium discoideum* (AAF80384 / 706 / GODZINA *et al.*, 2000)
 [48]: *Abies magnifica* (AAG44096 / 756 / —)
 [49]: *Allium macrostemon* (BAA84603 / 762 / YOU *et al.*, 1999)
 [50]: *Costus speciosus* (BAB83253 / 759 / KAWANO *et al.*, 2002)
 [51]: *Avena strigosa* (CAC84559 / 759 / HARALAMPIDIS *et al.*, 2001)
 [52]: *Oryza sativa* (AAF03375 / 757 / DARR *et al.*, 1999)
 [53]: *Arabidopsis thaliana* (P38605 / 759 / COREY *et al.*, 1993)
 [54]: *Pisum sativum* (BAA23533 / 756 / MORITA *et al.*, 1997)
 [55]: *Glycyrrhiza glabra* (BAA76902 / 757 / HAYASHI *et al.*, 2000)
 [56]: *Panax ginseng* (BAA33460 / 758 / KUSHIRO *et al.*, 1998)
 [57]: *Olea europaea* (BAA86931 / 590 / SHIBUYA *et al.*, 1999)
 [58]: *Betula platyphylla* (BAB83085 / 767 / ZHANG *et al.*, 2003)
 [59]: *Luffa cylindrica* (BAA85266 / 765 / HAYASHI *et al.*, 1999)

Oxidosqualen-Lupeol-Cyclasen:

- [60]: *Olea europaea* (BAA86930 / 758 / SHIBUYA *et al.*, 1999)
 [61]: *Taraxacum officinale* (BAA86932 / 758 / SHIBUYA *et al.*, 1999)
 [62]: *Betula platyphylla* (BAB83087 / 755 / ZHANG *et al.*, 2003)
 [63]: *Medicago truncatula* (CAA75588 / 742 / GAMAS *et al.*, 1996)
 [64]: *Arabidopsis thaliana* (NP_178018 / 757 / HERRERA *et al.*, 1998)

Oxidosqualen- β -Amyrin-Cyclasen:

- [65]: *Avena strigosa* (CAC84558 / 757 / HARALAMPIDIS *et al.*, 2001)
 [66]: *Betula platyphylla* (BAB83088 / 779 / ZHANG *et al.*, 2003)
 [67]: *Panax ginseng* (BAA33461 / 763 / KUSHIRO *et al.*, 1998)
 [68]: *Medicago truncatula* (AAO33578 / 762 / ITURBE-ORMAETXE *et al.*, 2003)
 [69]: *Pisum sativum* (BAA97558 / 758 / MORITA *et al.*, 2000)
 [70]: *Lotus japonicus* (AAO33579 / 750 / ITURBE-ORMAETXE *et al.*, 2003)
 [71]: *Glycine max* (AAM23264 / 739 / —)
 [72]: *Glycyrrhiza glabra* (BAA89815 / 765 / HAYASHI *et al.*, 2001a)

Oxidosqualen- α -Amyrin-Cyclase:

- [73]: *Pisum sativum* (BAA97559 / 764 / MORITA *et al.*, 2000)

Oxidosqualen-Isomultiflorenol-Cyclase:

- [74]: *Luffa cylindrica* (BAB68529 / 759 / HAYASHI *et al.*, 2001b)

Konservierte Aminosäuren im Alignment der Triterpen-Cyclasen:

- Alle Triterpen-Cyclasen [Sequenzen 01-74]:
eine konservierte Aminosäure → W312
- Alle Squalen-Hopen-Cyclasen [Sequenzen 01-32]:
eine konservierte Aminosäure → W312
- Alle Squalen-Hopen-Cyclasen ohne *Archaea* [Sequenzen 01-28,32]:
17 konservierte Aminosäuren → W312, P373, D374, D376, D377, Q411, D447, Q479, G483, W489, Q527, D530, G531, W533, G534, T556, G577
- Alle Squalen-Hopen-Cyclasen ohne *Archaea*, *Rhodopirellula* und *Desulfitobacterium* [Sequenzen 01-26,32]:
46 konservierte Aminosäuren → Y95, G121, G122, L134, A135, P149, R171, S309, W312, D313, T314, D350, W351, G361, F365, P373, D374, D376, D377, W406, Q411, A419, D442, D447, Q479, G483, W485, G487, W489, G490, G496, W522, Q527, D530, G531, W533, G534, L535, T552, T556, G577, L581, G600, P602, Y609, Y612

Sequenzalignment der Triterpen-Cyclasen

```
[01] -----
[02] -----
[03] -----
[04] -----
[05] -----
[06] -----
[07] -----
[08] -----
[09] -----
[10] -----
[14] -----
[15] -----
[16] -----
[17] -----
[18] -----
[19] -----
[20] -----
[21] -----
[22] -----
[23] -----
[24] -----
[25] -----
[26] -----
[32] -----
[12] -----
[13] -----
[11] -----
[58] -----
[59] -----
[56] -----
[57] -----
[54] -----
[55] -----
[53] -----
[51] -----
[52] -----
[50] -----
[49] -----
[48] -----
[60] -----
[61] -----
[62] -----
[63] -----
[66] -----
[67] -----
[68] -----
[69] -----
[71] -----
[72] -----
[70] -----
[73] -----
[64] -----
[74] -----
[65] -----
[47] -----
[46] -----
[43] -----
[44] -----
[45] -----
[37] -----
[38] -----
[39] -----
[40] -----
[41] -----
[42] -----
[35] MLYQRRGRGEMHRPGIRTIVGSGNSTPSSLCAPFPFDSVIPPPRGLLERFLRRLTSTISWVVSFLLVCSIPFLLLIHA
[36] -----SVLLAAGR-----MLSLFLFFFTWPILLPHG
[33] -----
[34] -----
[29] -----
[27] -----
[28] -----
[31] -----
[30] -----
```

```

[01] -----
[02] -----
[03] -----
[04] -----
[05] -----
[06] -----
[07] -----
[08] -----
[09] -----
[10] -----
[14] -----
[15] -----
[16] -----
[17] -----
[18] -----
[19] -----
[20] -----
[21] -----
[22] -----MSISPTFSG
[23] -----
[24] -----
[25] -----
[26] -----
[32] -----
[12] -----
[13] -----
[11] -----
[58] -----MWLKI GAETARGDGGGGGS-----ETWLRSLNNHLGRQIWEFHP-----ELGTQE
[59] -----MWQLKIGADTVPADPSNAGG-----WLSSLNNHVGRQVWHFHP-----ELGTPE
[56] -----MWLKI AEGGNP-----WLRTLNDHVGRQIWEFDP-----NIGSPE
[57] -----
[54] -----MWLKV AEGGTP-----WLRTLNNHVGRQVWEFDP-----HSGSPQ
[55] -----MWLKI AEGGSP-----WLRTVNNHVGRQVWEFDP-----KLGSPPE
[53] -----MWLKI AEGGSP-----WLRTTNNHVGRQVWEFDP-----NLGTPE
[51] -----MWRLKI AEGGGD-----PWLRTKNAHVGRQVWEFDP-----EAGDPE
[52] -----RLRVAEGGGD-----PWLRTKNGHVGRQVWEFDP-----AAGDPD
[50] -----MWRLKI AEGGG-----PWLRTKNNHVGRQVWEFDP-----SLGTPE
[49] -----MWLLK MADGGN-----QWLRTTNNHAGRQIWEFDP-----NLGTPE
[48] -----MWLKI AEGGSP-----WLQTLNNHVGRQVWEFDP-----KAGTSE
[60] -----MWLKI ADG--T-----GPWLTTTNNHIGRQHWEFDP-----EAGTPD
[61] -----MWLKI AEGG--D-----DEWLTTTNNHVGRQHWFDP-----DAGTEE
[62] -----MWLKI AEG-----GPGLVSGNDFIGRQHWEFDP-----DAGTPQ
[63] -----
[66] -----MWRLKI ADGG--S-----DPYIYSTNNFVGRQTWEFDP-----QAGSPQ
[67] -----MWLKI AEGNKN-----DPYLYSTNNFVGRQTWEFDP-----YVASPG
[68] -----MWLKI GEGK--N-----EPYLFSTNNFVGRQTWEYDP-----EAGSEE
[69] -----MWRLKI AEGG--N-----DPYLFSTNNFVGRQTWEYDP-----EAGSEE
[71] -----MWRLKI ADGG--N-----DPYIFSTNNFVGRQTWEFDP-----EAGSPE
[72] -----MWRLKI AEGG--K-----DPYIYSTNNFVGRQTWEYDP-----DGGTPE
[70] -----PYIFSTNNFVGRQTWEYDP-----DAGTPE
[73] -----MWLKI GDGG--K-----DRNIFSTNNFVGRQTWEFDP-----DAGTSP
[64] -----MWLKI GKNGE-----DPHLFSSNNFVGRQTWKFDH-----KAGSPE
[74] -----MWRLKV ADGG--N-----DPYIYSMNNFIGRQIWEFDP-----NAGTPE
[65] -----MWRLTI GEGG-----GPWLKSNNGFLGRQVWEYDA-----DAGTPE
[47] -----FTRMTTTN-----WSLKVDRGRQTWEYSQ-----
[46] -----MGR--EFEP-----
[43] -----MTEGTCLRRRGGPYKT-----EPA
[44] -----MTEGTCLRRRGGPYKT-----EPA
[45] -----MTEGTCLRRRGGPYKT-----EPA
[37] -----MTEFYS-----DTIGLPKTD PRLWRLRT-----
[38] -----MYYS-----EEIGLPKTD I SRWRLRS-----
[39] -----MEACRVRP-----ELSKTVEQIDKSLWRLNI-----
[40] -----MIYG-----YTEKELEKTD PDGWRLIV-----
[41] -----MARKQATEAPAVSNGSPKKRSS--ADSDNHV--KRPRLOESTDKARWLSS-----
[42] -----MARATGSEAQETE QALS RKRSSG PCGEGPKHDFPKRPKIEKGTDPTRWRMRD-----
[35] LLVYCDGYNREVVARHRRKWLHQTVPHVRPVRVAPSPNPFLEGWHR CEDGRQRWHYGRLLNVEEGNELGKAQAEGCPTY
[36] LLTLLDRHNRVVLKHQQRWPFESVPHVRPVRVAASREFFIENWHLR CEDGRQRWCYGELLNEEGNTLGKAQAAGLTLI
[33] -----
[34] -----
[29] -----
[27] -----
[28] -----
[31] -----
[30] -----MRK

```

QW6

	1	10	20	30
[01]	-----MAEQVLEAP-----	-----AYARTLDRAVEYLLSCQ-----	-----KDEGYW	
[02]	-----MTQQLLDT-----	-----MVQATLEAGVAHLRRO-----	-----APDGYW	
[03]	--MTATTDGS-----	-----TGASLRPLAASASDITIPAAA-----	-----AGVPEAAARATRRATDFLLAKQ-----	-----DAEGWW
[04]	--MTATTDGS-----	-----TGA-LPPRAASASEPHDTIPQAAGSVGIQDAARATQRTDFLLSRQ-----	-----DAEGWW	
[05]	-----MRTQDRVQVN-----	-----SIAEATAASQKYLKLSLQ-----	-----NPAGYW	
[06]	-----MQTQDRVKVN-----	-----QVAEATAASQQYLLSLQ-----	-----NPAGYW	
[07]	-----MPTSLATAIDP-----	-----KQLQQAIRASQDFLFSQ-----	-----YAEQYW	
[08]	-----MIEKN-----	-----KVKQSILASQKHLKLSLQ-----	-----ETEGYW	
[09]	-----MQVQPRIEK-----	-----HLDSAIEASQAYLLARQ-----	-----YSPGYW	
[10]	-----MVIAASPSVPCP-----	-----STEQVRQAIASRDFLLSEQ-----	-----YADGYW	
[14]	-----MDSVNAT-----	-----AREAKESKISESEILESS-----	-----IASATQGVLFQ-----	-----QSDGHW
[15]	-----MDSGTFN-----	-----PGGER-----GNTLDAS-----	-----IDAARAAFLGYR-----	-----RDDGHW
[16]	-----MNKHSNG-----	-----RTAID-----PAALEMS-----	-----IASATEADLAYS-----	-----HADGHW
[17]	-----MRTGTGTGSRKDMTAAARQSDQSEAKAMREAAVSKVETLQRPKTRDVSLLDVERGVQSAARATDMT-----	-----QADGHI		
[18]	-----MNDLS-QTQPR-----	-----DAVLPEAAGAVPPASAPAPAAASEEAPASLDTAITRATDAILAAQ-----	-----KPDGHW	
[19]	-----MNQAATITRPQ-----	-----DETLTTSARRPAQALPDP-----	-----LDAGIAHVVESLQ-----	-----QSDGHW
[20]	-----MTVSTSS-----	-----AFHHS-----PLSDDVEPI-----	-----IQKATRALEKQ-----	-----QQDGHW
[21]	-----MNATMDAT-----	-----APLRDPGAPSAENCSVDRR-----	-----ELDDVIGESCRWGERO-----	-----NQDGHW
[22]	SSL-----QKSSLSDH-----	-----STISEPFTVVDRVNGISAV-----	-----ALDDAITRARSALAAQ-----	-----REDGHW
[23]	-----MLREATAI-----	-----SNLEPPLTASYVES-----	-----PLDAAIRQAKDRLLSLQ-----	-----HLEGYW
[24]	-----MICSHMER-----	-----SSLVLPASIDSHSRESETT-----	-----GLDQAIVRARAALGRQ-----	-----GADGHW
[25]	-----MAKGIILNKFAVIAG-----	-----NKNAGLTAEECTVVAPIKEVSGKAVHCRQAVKMAEYLLALQ-----	-----NPEGYW	
[26]	-----MAKGIILNKFAVIAG-----	-----TKKAGPPAGEERTVIAPIKEISGKAVHCSQAVKMAEYLLALQ-----	-----NPEGYW	
[32]	-----MSPFLOASDDNNPLFKES-----	-----CQALDHATEFARDTL-----	-----VNKEHW	
[12]	-----MLLYEK-----	-----AHEEIVRRATLQTMQ-----	-----WQDGTW	
[13]	-----MLLYEK-----	-----VHEEIARRTTALQTMQ-----	-----RQDGTW	
[11]	-----MGTLOEK-----	-----VRRFQKKTITELRDRQ-----	-----NADGSW	
[58]	ELQQIDDARRRFWERRFERRHSSDLLMRIQFAKENPSSANIP-QVKIKDTEEVREEAVGMTLRRAINFYSTIQ-ADDGHW			
[59]	DLQQIQHARQRFSDHRFEKKHSADLLMRMQFAKNSSVFNLP-QIKVKDKEDVTEEAVSRTLRRAINFYSTIQ-GDDGHW			
[56]	ELAEVEKVRNFRNHRFEKKHSADLLMRIQFANENPGSVVLP-QVKVNDGEDI SEDKVTVTLKRAMSFYSTIQ-AHDGHW			
[57]				
[54]	DLDDIETARRNFHDNRFTHKHSDDLMLRQFAKENPMNEVLP-KVKVKDVEDVTEEAVATTLRRLNIFYSTIQ-SHDGHW			
[55]	DLLEIEKARQNFHDNRFTHKHSADLLMRIHFAKENPMNEVLP-KVRVKDIEDVTEETVKTTLRRAINFHSTLQ-SHDGHW			
[53]	DLAAVEARKSFSDNRFVQKHSADLLMLRQFSRENLI SPVLP-QVKIEDTDDVTEEMVETTLKRGLDFYSTIQ-AHDGHW			
[51]	ALAAVEAARRDFAAGRHLKHSDDLMLRIQFEKENPLKLDLP-AIKLEENEDVTEEAVSTSLKRAISRFTLQ-AHDGHW			
[52]	ELAAVEAARRGFARRHELKHSDDLMLRMQFAKNPLKLDIP-AIKLEBEHAVTGEAVLSSLKRAIARFYSTIQ-AHDGHW			
[50]	ETAEVERVREAFRETRFEKKHSADLLMLRQFAKENPLEMNYPI-IKIEEHEDVTEELVVTSLRKAISRFTLQ-AHDGHW			
[49]	ETEAVERNAREIYRKNRFKMKHSADLLMLRQFAKENPAEIGLP-QVKLAENENITEEAAAITLRRAMNRYSTLQ-AHDGHW			
[48]	DHLAVEKARVDFYKNRFIQHHSADLLMLRQCGGENPLSPLPA-QVKLESANDITEEVIQTTLVRAIRFYATIQ-AHDGHW			
[60]	ERAVEERLREFFKKNRFRKQKQADLLMRMQVLEKNRQVIPP-AIKIKETEGITEEAVITTLRRAINFYSTIQ-AHDGHW			
[61]	ERAEIEKIRLNFKLNRQFKQKQADLLMRQQLRKENPINKIPD-AIKLNETEEVTNDAVTTTLKRAISRFTLQ-AHDGHW			
[62]	ERAEVEKVRREFFTKNRFQMKQKQADLLMRQQLRKENPCQVIPP-PVKVKETEVIITEEAVITTLRRSLSFYSSIQ-AHDGHW			
[63]				
[66]	ERAEVEEARRNFYDNRVQVKPSGDLWRMQFLREKNFKQTIIP-PVKVEDGEEITYEKSTAALRRAVHVFYSALQ-ASDGHW			
[67]	ELEEVEQVRRQFWDNRVQVKPSGDLWRMQFLREKNFKQTIIP-QVKVGDDEAVTYEAAITTLRRAVHVFYSALQ-ASDGHW			
[68]	ERAQVEEARKNFYDNRVQVKPCGDLWRQVFLRENNFMQTIID-GVKIEDGEEITYEKATTTLRGTHHFAALQ-TSDGHW			
[69]	ERAQVEEARRNFYNNRFVVKPCGDLWRQVFLRENNFKQTIIG-GVKIEDGEEITYEKATTTLRGTHHFAALQ-TSDGHW			
[71]	ERAQVEAARQHFYNNRFVVKPCADLLWRQVFLRENNFKQTIIP-RVTIEDGEEITYQKVTSAVRRGAHHAALQ-TSDGHW			
[72]	ERAQVDAARLHFYNNRFVVKPCGDLWRQVFLRENNFKQTIIP-SVKIEDGEEITYEKATTAVRRGAHHAALQ-TSDGHW			
[70]	ERAQVEEARQDFYNNRFVVKPCGDLWRQVFLRENNFKQTIIP-SVKIEDGEEITYEKATTTLKRGAHHAALQ-TSDGHW			
[73]	EKAQVEAARQHFYDNRVFKACSDLLWRQVFLRENNFKQTIIE-SVKIEDGEEI SEENVAITTLRRAVHHAALQ-SNDGHW			
[64]	ERAAVEEARRGFLDNRFRVKGCSDDLWRMQFLREKFKQGIIP-QLKATNIEEITYETTALRRGVRVFTALQ-ASDGHW			
[74]	ERAEIERLRRHFTKNRHKGFPSADLLWRQVFLREKNRQVIPP-AVKVGDGEEISYEMALDAMRRGAHHAALQ-ASDGHW			
[65]	ERAEVERVRAEFTKNRFQKQKQADLLLRQYAKDNPLPANIPTEAKLEKSTEVTHETIYESLMRALHQYSSIQ-ADDGHW			
[47]	-----EKKEATDVDIHLLRLKEPG-----	-----THCP-----	-----EGCDLNRAKTPQQAIIKKAFOYFSKVQ-----	-----TEDGHW
[46]				
[43]	TDLTRWRLQNELGRQRWTTYQAEDDPGREQTGLEAHSGLDIT-----	-----RSYFTDLPKAQTAEHALNGVTFYAKLQ-----	-----AEDGHW	
[44]	TDLTRWRLHNELGRQRWTTYQAEDDPGREQTGLEAHSGLDIT-----	-----TSYFKNLPKAQTAEHALNGVTFYAKLQ-----	-----AEDGHW	
[45]	TDLGRWRLNCERGRQTWTYLQDER-AGREQTGLEAYALGLDIT-----	-----KNYFKDLPKAHTAFEGALNGMTFYVGLQ-----	-----AEDGHW	
[37]	--DELGRESWEYLTPQQAANDPPSTFTQWLLQDPKFPQHPHE-----	-----RNKHSPDFSAPDACHNGASFFKLLQEPDSCGIF-----		
[38]	--DALGRETWHLYSQSECESEPQSTFVQWLLQSPDFPSP-PS-----	-----SDIHTSG-----	-----EAARKGADFKLQ-----	-----LDNGIF
[39]	--DSAGGETWEYVTKKEAEK-RPLTIAEKYFLGFDLD-----	-----LPKRPPAKTPLESAYGYEFRRRLQ-----	-----LPDGHW	
[40]	--EDTGRQRWYKLYKTEEERRERPQTYMEKYFLGKNMD-----	-----LPEQPAAKTPIESARKGFSFYKHLQ-----	-----TSDGHW	
[41]	--EGG-RHTWHYLEDDEAAKEWPQSYADKYFLGMLPKHPAE-----	-----LPELPKATNPLDAVRNGLTFFFEKLQ-----	-----LPEGHW	
[42]	--DES-RHTWHYLPSEAAKAWPQTCADKYFLGMLPLG-----	-----LPSLPQPTTPLDSARNGLTFFFEKLQ-----	-----LPSGHW	
[35]	PYGEAGNANDDFEDTGA TRTGRGGPDMRAVKEERCFRVERYQLGLTGTAVHKPRGSVEEAMRAGAEFLRLRQHPYSGHW			
[36]	PSEDVPMVGEHYEWAAGNVVPTPKPEPDMRAIKAKQRFFLEQYQLGLHNTTEIRRRASPEDAMRDGVEFLRLRQHPYSGHW			
[33]	-----HDPTARAAARLLETQ-----	-----QPAGCW		
[34]	-----RAAMKHLKLSLQ-----	-----RSAGDW		
[29]				
[27]	-----MDGGDRILNFGKNLSDSLDKAQTYVSEGEVQIILADKLDQDGHV			
[28]	-----MMAVVENSVSEVLDRELRGLDILLRGEFLAQR-----	-----TKDGHW		
[31]	-----MPRRCRPPSRRYG-----			
[30]	VLGFIIVLVLIITPVSAVSMLDYSVSIKKNYKDVTRTRDLSLIVMALSALAFNRDDELSEYEIWHFTEKILISWQ-NDDGHW			

	40	50	60	70	80	
[01]	WGPLLSNV	MEAEYVLLCH	ILDR	VDRDRMEK	IRRYVLLH-E	QRE--DGTWALYPGCPP
[02]	WAPLLSNVC	MEAEYVLLCHCL	GK	KNPERBAQ	IRRYVLLH-E	ORR--EDGTVSIIYPGCPP
[03]	KGDLETNVT	MDAEDLLLRQFL	GI	QDEETTRAAAL	FIRG-E	QRE--DGTWATFYGGPP
[04]	KGDLETNVT	MDAEDLLLRQFL	GI	QDEKTTRAAAGL	FIRG-E	ORA--DGTWATFYGGPP
[05]	WAELESNV	ITAEVLLHKL	WGT	DKTRPLHK	VEAVLRS-Q	QKQ--HGGWELFYGDGG
[06]	WAELESNV	ITAEVLLHKL	WGT	DQTRPLHK	VEAVLRS-Q	QRQ--HGGWELFYGDGG
[07]	WAELESNV	ITAEVLLHKL	WGT	EQRLPLAKA	EQVLRNH	QRD--HGGWELFYGDGG
[08]	WQLESNV	ITAEIILLHKL	WQT	DKKIPLNKAK	NYLIS-Q	QRE--HGGWELFYGDGG
[09]	WAELESNV	SMTAEVLLHKL	WRT	DTGRPLAKA	TAHLA-E	QRA--HGGWELFYGDGG
[10]	WSELESNV	ITAEVLLHKL	WGT	AAQRPLEKAK	NYLQ-Q	ORD--HGGWELFYGDGG
[14]	VFELEADCT	IPAEYVLLRH	YLAE	VDTVLEAKI	IGNVLR-RV	QG--AHGGWPLVHDGPF
[15]	VFELEADCT	IPAEYVLLRH	YLAE	IDAALAEAKI	AVVLR-RT	QG--AHGGWPLVYDGEF
[16]	AFELEADST	IPSEYILLRH	YLAE	IDVVLEAKI	IGNVLR-RT	QG--AHGGWPLVHDGPF
[17]	CFELEADAT	IPSEYILLRH	YFRT	PRAGLEAKI	IGNVLR-RT	QS--KVVHGGWALVHDGPF
[18]	VYELEADAT	IPAEYVLLRH	YLAE	PNVELEQKI	AVVLR-RI	QL--PDGGWPLFTDGEF
[19]	VYELEADAT	IPAEYVLLRH	YLAE	PDLVLEGKI	AVVLR-RI	ION--ADGGWPLFHAGAS
[20]	VFELEADAT	IPAEYVLLRH	YLAE	EDLEIEAKI	GRVLR-RI	QG--EHGGWELFYGDGG
[21]	VFELEADAT	IPAEYVLLRH	YLAE	IDDAREARI	ASVLR-AI	QG--KHGGWPLFHDGDF
[22]	CFSLEADCT	IPAEYVLLRH	YLAE	IDTALERRI	ANVLR-R	QVTDGHGGWPLFYGDGF
[23]	VFELEADCT	IPAEYVLLRH	YLAE	IDAALQAKI	AVVLR-RH	QSA--DGSVPLFRGAG
[24]	CFELESDC	ITAEYVLLRH	YLAE	IDEDLQER	MARYLRA-T	QVQETHGGWPLFYGDGF
[25]	VFELEADVT	IPSEYILLRH	YLAE	ISPRLMRE	LVLLD-R	QLP--DGGWPLVAVDGF
[26]	VFELEADVT	IPSEYILLRH	YLAE	ISPRLMRE	LVLLD-R	QLP--DGGWPLVAVDGF
[32]	CGWVLSNV	ITAEYVLLRH	YLAE	MSNEDRRG	FVLRHFTS-S	ORP--DGSVPLFRGAG
[12]	RFCFCGAP	LTDCHMI	FLLKLLGRD	KEIEPFV	ERVAS---	LQ--TNEGTVKLVHEDEVG
[13]	RFCFCGAP	LTDCHMI	FLLKLLGRD	KEIEPFV	KRLAS---	LQ--TNEGTVKLVYEDEVG
[11]	TFCFCGAP	LTDCHMI	FLLKLLGRD	ENEKELI	SSLAAGIH-AKQ	Q--PDGTFINYPDETR
[58]	PGDYGCP	MPGLVITLS	ITGA	LNAFLSKEH	QCEICRYLYNH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[59]	PGDYGCP	MPGLVITLS	ITGA	LNAVLSTE	HQREICRYLYNH	QN--KDDGGWGLHIEGFS
[56]	PGDYGCP	MPGLVITLS	ITGV	LNVVLSKE	HKREICRYLYNH	QN--RDGGWGLHIEGFS
[57]	PGDYGCP	MPGLVITLS	ITGV	LNVVLSKE	HKREICRYLYNH	QN--RDGGWGLHIEGFS
[54]	PGDYGCP	MPGLVITLS	ITGA	LNAVLTE	HRKEIMRYLYNH	QN--KDDGGWGLHIEGFS
[55]	PGDYGCP	MPGLVITLS	ITGA	LNAVLTE	HRKEIMRYLYNH	QN--KDDGGWGLHIEGFS
[53]	PGDYGCP	MPGLVITLS	ITGA	LNTVLSQ	EHQCEIMRYLYNH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[51]	PGDYGCP	MPGLVITLS	ITGA	LNTVLSQ	EHQCEIMRYLYNH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[52]	PGDYGCP	MPGLVITLS	ITGA	LNTVLSQ	EHQCEIMRYLYNH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[50]	PGDYGCP	MPGLVITLS	ITGA	LNTVLSQ	EHQCEIMRYLYNH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[49]	PGDYGCP	MPGLVITLS	ITGA	LNTVLSQ	EHQCEIMRYLYNH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[48]	PGDYGCP	MPGLVITLS	ITGA	LNTVLSQ	EHQCEIMRYLYNH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[60]	PAESACPL	FLLPPLV	IALLYVTGA	LNAVLS	SEMHHKEICRYLYNH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[61]	PAESACPL	FLLPPLV	IALLYVTGA	LNAVLS	SEMHHKEICRYLYNH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[62]	PGESACPL	FLLPPLV	IALLYVTGA	MNDILT	PAHQEIKRYLYNH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[63]	PGESACPL	FLLPPLV	IALLYVTGA	MNDILT	PAHQEIKRYLYNH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[66]	PAENACPL	FLLPPLV	VMCMYITGH	LNTVFP	AEHQEILRYIYH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[67]	PAENACPL	FLLPPLV	VMCMYITGH	LNTVFP	AEHQEILRYIYH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[68]	PAQIACPL	FLLPPLV	VMCMYITGH	LDSVFP	PREHRKEILRYIYH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[69]	PAQIACPL	FLLPPLV	VMCMYITGH	LDSVFP	PREHRKEILRYIYH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[71]	PAQIACPL	FLLPPLV	VMCMYITGH	LDSVFP	PREHRKEILRYIYH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[72]	PAQIACPL	FLLPPLV	VMCMYITGH	LDSVFP	PREHRKEILRYIYH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[70]	PAQIACPL	FLLPPLV	VMCMYITGH	LDSVFP	PREHRKEILRYIYH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[73]	PALNACPL	FLLPPLV	VMCMYITGH	LDSVFP	PREHRKEILRYIYH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[64]	PGEITCPL	FLLPPLV	VMCMYITGH	LEEVD	AHRKEILRYIYH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[74]	PSETS	CPLFVCP	LLICMYITGF	MDKVFS	PEHKEMMYIYNH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[65]	PGDYS	CPLFVCP	LLICMYITGF	LDTFLS	PEHRKEICRYLYNH	QN--EDGGWGLHIEGFS
[47]	AGDYGCP	MPGLVITLS	ITGV	YQLPE	STQREIRYLYFNR	QNP--VDGGWGLHIEGFS
[46]	AGDYGCP	MPGLVITLS	ITGV	YQLPE	STQREIRYLYFNR	QNP--VDGGWGLHIEGFS
[43]	AGDYGCP	MPGLVITLS	ITGV	YQLPE	STQREIRYLYFNR	QNP--VDGGWGLHIEGFS
[44]	AGDYGCP	MPGLVITLS	ITGV	YQLPE	STQREIRYLYFNR	QNP--VDGGWGLHIEGFS
[45]	TGDYGCP	MPGLVITLS	ITGV	YQLPE	STQREIRYLYFNR	QNP--VDGGWGLHIEGFS
[37]	PCQYKCP	MPGLVITLS	ITGV	YQLPE	STQREIRYLYFNR	QNP--VDGGWGLHIEGFS
[38]	PCQYKCP	MPGLVITLS	ITGV	YQLPE	STQREIRYLYFNR	QNP--VDGGWGLHIEGFS
[39]	ASPYE	CPLFVCP	LLICMYITGF	TPFPK	GWAPETIQVLI	HN--TN--DDGGWGLHIEGFS
[40]	ACEYGC	MPGLVITLS	ITGV	IEFP	DEMREIVIRYLYNH	ANP--EDGGWGLHIEGFS
[41]	GCEYGC	MPGLVITLS	ITGV	NPVP	WYATETIKNYL	FAR--ANP--VDGGWGLHIEGFS
[42]	GCEYGC	MPGLVITLS	ITGV	NPVP	WYATETIKNYL	FAR--ANP--VDGGWGLHIEGFS
[35]	PNDYS	CPLFVCP	LLICMYITGF	TPIPS	AYATAMKDYLSAR	AN--AN--DDGGWGLHIEGFS
[36]	PNDYS	CPLFVCP	LLICMYITGF	TPIPS	AYATAMKDYLSAR	AN--AN--DDGGWGLHIEGFS
[33]	EGEMI	WCPV	TAQVAITR	RVVGM	FS	DADAAKIIRHFEF-S-QL--PNAFGLHPHPG
[34]	EGEMV	WCPV	TAQVAITR	RVVGM	FS	DADAAKIIRHFEF-S-QL--PNAFGLHPHPG
[29]	SPSPG	ATALAS	LALLAL	GREFKG	AQ	RGIQWLV--QNN--RGGWELKVPVGGOP
[27]	SPSPG	ATALAS	LALLAL	GREFKG	AQ	RGIQWLV--QNN--RGGWELKVPVGGOP
[28]	TGELS	SASAL	STATAS	MSAAVRS	GKLAG--ADKA	ALLEQIQSGRRMLADQ--QND--DGGWGLHIEGFS
[31]	GYFYG	STSSV	PDTGF	ALIAL	SKARKVAWS--DPK	REEMIRSAIVKGVIIY-LERS
[30]	GYFYG	STSSV	PDTGF	ALIAL	SKARKVAWS--DPK	REEMIRSAIVKGVIIY-LERS


```

90      100      110      120      130      140      150
[01] D---LDTTIEAVVALKYIIGM---SRDEEPMQAKLRFTIQSQ--GGIESSRVFTRMVLALVGEYPWEKVPMPVPEIMFLGK
[02] D---LNATVEAVVALKYVIGE---PASDPQMVOAKEFIQNE--GGIESTRVFTRILWLAMVGOYPWDKLVIPPEIMHLPK
[03] E---LSTTIEAVVALRLAGD---SPEAPHMARAAEWTRSR--GGIASARVFTRIWLALFGWVKWDDLPELPPELIYFPT
[04] D---LSATIEAVVALRLAGD---GPDEPHMAKASAWTRER--GGIASARVFTRIWLALFGWVKWDDLPELPPELIYFPK
[05] E---LSTSVEAVMALKLLGV---PATDPAMIQARDFILQR--GGISKTRIFTKFLHALIGCYNWRGLPSLPAWVMLLPN
[06] E---LSTSVEAVMALRLGV---PATDPAMIRQAFTILQR--GGISKTRIFTKLHLALIGCYNWRGIPSLPPWIMLLPK
[07] D---LSTSVEAVMCLRLGV---PETDPALVKARQFILLAR--GGISKTRIFTKLHLALIGCYDWRGIPSLPPWIMLLPE
[08] D---LSTIEAVMALRLGV---SRTDPIIMBAQNFITKK--GGISCSRIFTKLHLALIGCYSWQOIGPSIPSSIMLLPE
[09] D---LNTSIEAVMALKLLGL---TADHPALARARAFILAK--GGISRARIFTKIHLALIGCYDWRGVPSIPWVWMLLPE
[10] E---LSTSVEAVTALRLGV---PATDPALVKAKNFILVGR--GGISKSRIFTKMHLALIGCYDWRGTPSIPWVWMLLPN
[14] D---MSASVKAVFALKMIGD---SIDAPHMVRAREATHAR--GGAIHSNVFTRFMLAMFGIVTWRAVPVLPITIMLLPF
[15] D---LSTIEAVMALRLGV---SIDAPHMKAAREATHAR--GGAVHANVTRFLLAMFGILLTWRAVPLVLPITIVLLPI
[16] D---MSASVKSVFALKMIGD---SVDAAHVMKAREATHAR--GGAANSNVLTRFLLALYGVVSWRAVPVLPITIVLLPI
[17] D---MSASVKAVFALKMIGD---DIEAPHMRAVRKAITLQR--GGAANANVTRILLALYGEVPTAVVPMVPEVMMHLPK
[18] D---VSASVKAVFALKMIGD---PADAEHMVRAREATHAR--GGAEAVNVFTRILLALYGVVSWRAVPMMPVPEIMLLPE
[19] D---ISASVKAVFALKMIGD---NPEAEHMRARATHAM--GGAASNVFTRILLALYGVMPQAVPMPVPEIMLLPE
[20] D---LSATVKAVFALKMIGD---SPDAPHMLRARNETILAR--GGAMRANVTRIQALALFGAMSWEHVQMPVPEIMLLPE
[21] D---MSATVKAVYALKLTGD---GVDEPHMVRARQAIIIEH--GGAERTNVFTRFTLAMFDQVPRACPVTPVBALLLPR
[22] D---MCSVKVYALKLAGD---SPEAAHVMRARNATILER--GGAARSNVFTRILLAMYRQIPWRGVPFVPAEIMLLPR
[23] D---ISCTVVKVYALKLAGD---SIDAPHMKAAREATHAR--GGAARSNVFTRIMLAMFEQIPWRGVPFVPAEIMLLPK
[24] D---LSCVTKAVYALKLAGD---SPEAPHMRRAREAVLAL--GGAAKSNVFTRIILLAMFEQVPWRAVPVLPITIVLLPR
[25] A---NISATVKAVLALKVLGH---SPQAPHMIRARIMVLSL--GGAARCNVFTRIILLALYGLPWHTPPAMPVPEIVLLDQ
[26] A---NISATVKAVLALKVLGH---SPQAPHMIRARLMVLSL--GGAARCNVFTRIILLALYGLPIWHTPPAMPVPEIVLLDQ
[32] GGE-LSCTVVKVYALKLIGV---SPEEDYVMVRARDYVRS--GGAEKMRNLSRFHLLAMFGILIPWAAVQMPPELIFMPS
[12] G---NLSATIQSVAALLASKKY---TKEDANMKRAENFIQER--GGVARAHFMTKFLLAHGEYEPYPSLFHLPTPTMFLQN
[13] G---NLSATIQSVAALLASKKY---TKEDVNMKRAEMFINER--GGVARAHFMTKFLLAHGEYEPYPSLFHLPTPTMFLQN
[11] G---NLTATVQGVYVGLASGCF---HRTEPHMKAEQFTIISH--GGLRHVHFMTKWMWLAANGLYPWPALY-LPLSLMALPP
[58] T---MFGTALNYITLRLLG-EP-EDGMG-AVEKARKWILDH--GGATAITSWGKMWLSVLGVYBWSGNPLPPEVWLLPY
[59] T---MFGSVLNYVSLRLLG-EEAEDGQG-AVDKARKWILDH--GGASAITSWGKMWLSVLGVYBWSGNPLPPELWLLPY
[56] T---MFGTALNYVTLRLLG-EGANDGQG-AMEKGRQWILDH--GSATAITSWGKMWLSVLGVYBWSGNPLPPEWLLPY
[57] T---MFGSVLNYVTLRLLG-EEANDGQG-AMEKGRQWILDH--GGATAITSWGKMWLSVLGVYBWSGNPLPPEWLLPY
[54] T---MFGSVLCYVTLRLLG-EGPNDGEG-DMERGRDWILIEH--GGATYITSWGKMWLSVLGVYBWSGNPLPPEWLLPY
[55] T---MFGSVLNYVALRLLG-EGPNDRQG-EMEKGRDWILIGH--GGATFITSWGKMWLSVLGVYBWSGNPLPPEWLLPY
[53] T---MFGSVLNYVTLRLLG-EGPNDGEG-DMEKGRDWILINH--GGATNITSWGKMWLSVLGAFBWSGNPLPPEWLLPY
[51] T---MFGSALTYVSLRLLG-EGPESGDG-AMEKGRNWILDH--GGATYITSWGKFWLAVLGVYBWSGNPLPPEWMLPY
[52] T---MFGSALTYVSLRLLG-EGPDSGDG-AMEKGRKWILDH--GGATYITSWGKFWLAVLGVYBWSGNPLPPEWMLPY
[50] T---MFGSALTYVILRLLG-EGPDDGDG-AMEKGRKWILDH--GSATAITSWGKMWLSVLGVYBWSGNPLPPEWMLPY
[49] T---MFGSVLAVVTLRLLG-EGADGGDQAMQKGRKWILDH--GSATAITSWGKFWLAVLGVYBWSGNPLPPEWMLPY
[48] T---MFGTALNYVTLRLLG-QAPDGGQG-AMEKGCWILDH--GGATAITSWGKMWLSVLGVYBWSGNPLPPEWMLPY
[60] T---MFGSVLSYITLRLGEGQE-DGEDKAVARGKRWILDH--GGAVGITSWGKFWLAVLGVYBWSGNPMPPEFWLLPN
[61] T---IFGSVLSYITLRLGEEADSVAEDMALVKGRKWILDH--GGAVGITSWGKFWLAVLGVYBWSGNPMPPEFWMLPK
[62] T---MFGSALSVALRLLGEGLE-DGEDGAMAKSRKWILDH--GGLVAITSWGKFWLAVLGLYBWSGNPLPPEFWFLPD
[63] -----
[66] T---MFCITALSYICMRLLG-EGPDGGQDNACARARKWILDH--GGVTHMPSWGKTWLSILGIFBWIIGSNPMPPEFWILPS
[67] T---MFCITLTSYICMRLLG-EGPDGGVNNACARGKRWILDH--GSVTAITPSWGKTWLSILGVYBWIIGSNPMPPEFWILPS
[68] T---MFCITALNYICMRLLG-EGPDGGQDNACARARNWIRAH--GGVTYITPSWGKTWLSILGLFDWLIGSNPMPPEFWILPS
[69] T---MFCITALNYICMRLLG-EGPDGGEDNACVRARNWIRQH--GGVTHITPSWGKTWLSILGVYBWIIGSNPMPPEFWILPS
[71] T---MFCITALNYICMRLLG-EGPNGGHDNACARARKWIRDH--GGVTHITPSWGKTWLSILGVYBWIIGSNPMPPEFWILPS
[72] T---MFCITALNYICMRLLG-EGPDGGQDNACARARKWILDH--GGVTHITPSWGKTWLSILGVYBWIIGSNPMPPEFWILPS
[70] T---MFCITALNYICMRLLG-EGPDGGQDNACARARKWILDH--GGVTHITPSWGKTWLSILGIFDWKIGSNPMPPEFWILPS
[73] I---MFCITVLYNYICMRLLG-EGPNGGKEDACARARKWILDH--GSVTHVSSWGKTWLSILGVYBWIIGSNPMPPEFWMLPS
[64] V---MFCITVLYNYICMRLLG-ENPE---QDACRKRQWILDH--GGVITFITPSWGKFWLSILGVYBWDWGSNTPTPEFWMLLPS
[74] N---MFCITFNLYISLRLLG-EEPD---VEAVCKARNWILDH--DGVTSILSWGKTWLSILNVYBWSGNPMPPEFWMLPT
[65] T---MFGSCMNYATLMLLG-EKRNGDHKDALEKGRSWILSH--GTATAIPQWGKIWLSILGVYBWSGNPLIPELWLLPH
[47] D---IFCTITLQYVSLRLLG---VPADHPSVVKARTFLLQN--GGATGITPSWGKFWLAVLNVYBWSGNPLIPELWLLPY
[46] Q---VFTSVLNYVALRLLG---VDAGDAGLRARQWFLPR--GGPLSSGAWKILIALGLYBYNGLQMPPELWLLPE
[43] T---VFCITALNYVALRLLG---IGPDDPDLVRARNVILHKK--GGAVAITPSWGKFWLAVLNVYBWSGNPLIPELWLLPE
[44] T---VFCITALSYVSLRLLG---IGPDDPDLVRARNVILHKK--GGAVAITPSWGKFWLAVLNVYBWSGNPLIPELWLLPE
[45] T---VFCITALNYVSLRLLG---VGPDDPDLVRARNVILHKK--GGAVAITPSWGKFWLAVLNVYBWSGNPLIPELWLLPD
[37] T---VFCITVLYNYVILRLLG---LPKDHVPCAKARSTLRL--GGAIGSPHWGKIWLSALNLYKWEQVNPAPPEWLLPY
[38] T---CFCTITMNYVCLRLLG---MEKDHVPLVKARKTLHRL--GGAIKNPHWGKAWLSILNLYBWEQVNPAPPEWLLPY
[39] T---VFCITMNYVVLRLLG---MDAGHPVATRARNRHEL--GGAIGCPHWGKFWLAVLNCYBWEQVNPAPPEWLLPD
[40] T---VFCITALNYVVLRLLG---LGPDPVPTMKARIRLNEL--GGAIGCPQWGKFWLAVLNCYBWEQVNPAPPEWMLPE
[41] T---MLCITLNYITLRLVG---VEADHPVMVKARATMHKM--GGAITYAPHWAKFWLAVLNCYBWEQVNPAPPELWLLPD
[42] S---AFCITALNYVALRLVG---VEANEPMMIKARAALHRL--GGALNAPHWAKFWLAVLNVYBWSGNPMPPELWLLPD
[35] T---MLCITVLYNYVALRLMG---VSDDSDAARARQWIRGE--GGAIVSPTWGKVVWLCVGLYBWDGVPNPAPPELWLLPN
[36] T---MLCITALNYVALRFMG---VPADDADATRARAWIRSH--GGAIVSPTWGKVVWLCVGLYBWDGVPNPAPPELWLLPA
[33] S---VFTVTLVYVAARCLG---VSAEHAVTAKARGWLAHQP--GGVLSAPTWGKFWLAVLGLYGRDGLRPLPELWLLPK
[34] Y---VFTVTLVYVALRLLG---LGPETSMLARARWLAHQP--EGVKAVPTWGKFWLAVLGLYBWSGNPMPPELWLLPR
[29] -----
[27] D-----EEITKIARLALQG-----SQGGWMAKLVQLVLSA-----QFSQMILITLQORVVPGLGEETPEEITLIPNI
[28] N-----IATSVLVAAWT-----LSDQVTGETTDANQISR-----LRNWIQLAGELDGLRRRYGKDKTFVVPFI
[31] RVRVLAITIAVLIATAAPTALDWKNTPEYKELQTECADAVKA-CTVWVWITTDREGGYPYLAHAHLNPNQLTFGYEHLKATSL
[30] D---YRSTLLASAAVLMAG-----YDYDYVKASYEITKDKMPDPPFFLYLWIVVTKNVTGIVPKNAIEKLESIKGSEDK

```

```

160      170      180      190      200      210
[01]  RMPLNIYDFGSGWARATVVALSIVMSRQPVFPLP---ERARVP-----ELYETD-VPPRR---RGAKGGG---GW
[02]  SVPLNIYDFASWARATIVTLVSRHESPTCDATS---GLCKGS-----GIVRGE-GPPKR---RSAKGGD---SG
[03]  WVPLNIYDFGCGWARQTIIVPLTIVSAKRPPVRPAP---FPDEL-----HTDPARPNNPRP---LAPVASW---DG
[04]  WMPPLNIYDFGCGWARQTIIVPLTVVSAKRPPVRPAP---FPDEL-----HADANDPNPAK---LAPMVSW---DG
[05]  QFPVNIYEMSSWARSSSTVPLLVVFDQKPVYQVN---PTITLD-----ELYAEGVENVRY---ELPRSGD---WTD
[06]  AFPVNIYEMSSWARSSSTVPLLVVCDRKPVFITD---PTINLD-----ELYAEGIDRVRW---ELPQSGD---WTD
[07]  GSPFTIYEMSSWARSSSTVPLLVMDRKPVYGM---PPIITLD-----ELYSEGRANVVW---ELPRQGD---WRD
[08]  DFPFTIYEMSSWARSSSTVPLLVVFDKPIFSVN---PTINLD-----ELYAEGINNASF---ELPRKYD---LTD
[09]  AFPVNIYEMSSWARSSSTVPLLVVFDKRPVFAVE---PAITLD-----ELFVEGRAQARF---DLPRSSDWWAN
[10]  NFFFNIYEMSSWARSSSTVPLMIVCDQKPVYDIA---QGLRVD-----ELYAEGMENVQY---KLPESGT---IWD
[14]  WSPFFHINKISYWARITMVPMLVIAALKPRAKPN---KGVGID-----ELFLQDPRSIGMT---AKAPHOSMAWFL
[15]  WSPFFLNKISYWARITIVPLMLVLAALKPRAVNR---LGVGLD-----ELFLQDPKSIKMP---ARGPHQNRGLFA
[16]  WSPFFHLYKISYWARITIVPLMLVLAALKPRAKPN---KGVGIE-----ELFLQDTKSVGMN---PKAPHOSWGWFL
[17]  WFPFFLDKVSYWARTMVPFLVVIQAKKPRANPN---RGVVA-----ELFVTPPDSVRTW---PGSPHATWPWT
[18]  WFPFFHLSKVSYWARTIVVPLLVVLAALKPRAKPN---RRVRID-----ELFRGAPVNTGPR---DRAPHOHAGWFR
[19]  WFPFFHLSKVSYWARTIVVPLLVVLAALKPRAKPN---RRVRID-----ELFVRPCQATRLP---RRAPHOSPLWVG
[20]  WFPFFHINKMAYWARTVLPVPLLVVLAALKPRAKPN---RGIILVD-----ELFVDPVLPVTLQE---SGDP---IWR
[21]  FAPFFHWSKVSYSWRTVMTPLMILYSRRARAANPN---RGIIVR-----ELFRRDPEVIRDW---LKNPTGHWIGDA
[22]  WFPFFHLSKVAYSWRTVMVPLSILCTLKAKAANPN---RNHIVR-----ELFTVDPPEMEK---NYFE---VRTPLNH
[23]  WFPFFHLDKVSYSWRTVMVPLSILCTLKAKAANPN---RNHIVR-----ELFTVDPPEMEK---NYFE---VRTPLNH
[24]  WAPFFHTEKMSYWARITVLPVPLTILCSLKARAANPN---KRVDIR-----ELFVTAPEQER---HYFTL---RGGLLNR
[25]  RFFFHLSKVSYSWRTVIVPMLLLYAKQPVCRIR---PEEGIP-----ELFNTPPDKLRNL---DGFOQ---SGRWKKN
[26]  WFFFHLSKVSYSWRTVIVPMLLLYAKQPVCRIR---PEEGIP-----ELFSTPPDKLRNL---DGFOQ---SGRWKKN
[32]  WSLVNIYKFSWARSNIIVGLMIRVHEPLYALP---NKGGLDNDYL---DELWLDPHYKAIPTVTVPLQLMQTSLGV
[12]  DSPFSIFELSSSARITHLIPMMLCLNKRFRVGGK---LLPNLN-----HIAGGGGE---WFREDRSP---VFQT
[13]  DSPLSIFELSSSARITHLIPMMLCLNKRFRVGGK---LLPNLN-----HIAGGGGE---WFREDRSP---VFQT
[11]  TLPPIHFYQFSSYARITHFAPMAVTLNQRFLVLRN---NISSLH-----HLDPHMTKNPFTWLRSDAFEERDLTS
[58]  LLPCHFGRMWGHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-STIQSLRKEELYTV---PYHEIDWNKARNDCAKEDLYYPHPLVQDIL
[59]  LLPPHFGRMWGHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PIIRSLRKEELYTV---PYHEVDWNKARNECAKEDLYYPHPLVQDIV
[56]  ILPPIHFGRMWGHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PTVLSLRKEEVFSV---PYHEIDWNQARNLCAKEDLYYPHPLIQDIL
[57]  IVPIHFGRMWGHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PIVLSLRKEELYTV---PYHEIDWNQARNLCAKEDLYYPHPLIQDIL
[54]  ALPVEHFGRMWGHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PTVLSLRKEELFTV---PYHDIDWNQARNLCAKEDLYYPHPLVQDIL
[55]  VLPPIHFGRMWGHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PTVLSLRKEELYTV---PYHDIDWNQARNLCAKEDLYYPHPLVQDIL
[53]  FLPIHFGRMWGHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-STVLSLRKEELFTV---PYHEVNWNEARNLCAKEDLYYPHPLVQDIL
[51]  RLPIHFGRMWGHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PLILELRNELYKT---PYSKIDWDSARNLCAKEDLYYPHPLIQDIL
[52]  FLPIHFGRMWGHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PLILELRNELYKT---PYNEVDWKNARLCAKEDLYYPHPLVQDIL
[50]  FLPVHFGRMWGHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PLILSLRKEELFNL---PFDQLDWNKARNECAKEDLYYPHPLVQDIL
[49]  VLPVHFGRMWGHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PTIISLRKEELFNV---PYDQVDWNAARNLCAKEDLYYPHPLIQDIL
[48]  FLPIHFGRMWGHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-GIVMSLRKEELYTV---PYEKIDWNQARNLCAKEDLYYPHPLVQDIL
[60]  FSPPIHFGKMLCYCRVLYMMPMSYLYGKRFVGPIT-GLVLSLRKEELYTV---PYHGINWNRARNLCAKEDLYYPHPLAQDML
[61]  FFPPIHFGKMLCYCRVLYMMPMSYLYGKRFVGPIT-ELVRDLRQELYTD---PYDEINWNKARNLCAKEDLYYPHPLVQDMV
[62]  IFPIHFGKMLCYCRVLYMMPMSYLYGKRFVGPIT-GLIQSLRQELYNE---PYHQINWNKARNLCAKEDLYYPHPLIQDIL
[63]  -----Q---PYDQINWNKARNLCAKEDLYYPHPLVQDML
[66]  FLPMHFAKMWGCYCRVLYMMPMSYLYGKRFVGPIT-PLILQLREELYTV---PYHQVNWKKVRLCAKEDLYYPHPLIQDIL
[67]  FLPMHFAKMWGCYCRVLYMMPMSYLYGKRFVGPIT-PLILQLREELYTV---PYNEINWRKTRVCAKEDLYYPHPLIQDIL
[68]  FLPMHFAKMWGCYCRVLYMMPMSYLYGKRFVGPIT-PLILQLREELHTQ---PYEKINWTKSRHLCAKEDLYYPHPLIQDIL
[69]  FLPMHFAKMWGCYCRVLYMMPMSYLYGKRFVGPIT-PLILQLREELHTQ---PYEKINWTKSRHLCAKEDLYYPHPLIQDIL
[71]  FLPMHF-----GPIT-PLILQLREELFTQ---PYEKVNWKKARHCAKEDLYYPHPLIQDIL
[72]  FLPMHFAKMWGCYCRVLYMMPMSYLYGKRFVGPIT-PLILQLREELFTQ---PYEKVNWKKARHCAKEDLYYPHPLIQDIL
[70]  FLPMHFAKMWGCYCRVLYMMPMSYLYGKRFVGPIT-PLILQLREELFTQ---PYEKVNWKKARHCAKEDLYYPHPLIQDIL
[73]  FLLKHPAKMLCYCRVLYMMPMSYLYGKRFVGPIT-PLILMLREELFTQ---PYEKVNWKKTRHLCAKEDLYYPHPLIQDIL
[64]  FLPIHFGKMLCYCRVLYMMPMSYLYGKRFVGPIT-PLILQLREELHTQ---PYEINWKKSRHLYAKEDMYHPLVQDML
[74]  WVPPIHFSNMICYTRITVMPMSYLYGKRFVGPIT-PLVQLRDELHTQ---PYDQINWKRVRHMCATBEDLYYPHPLVQDML
[65]  FLPIHFGRFWCFTRLIYMSMAYLYGKRFVGPIT-PTILALRQDLYSI---PYCNINWDKARDYCAKEDLYYPHPLVQDIL
[47]  NLPPIHFGRWGHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-DLVKDLRREIYQ---EYKINWSEQRNNSKLDMYYPHPLVQDIL
[46]  SLPFFHFSKLVWCHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PLLAALRNEIFEG---AYDQVDWVAARARVSPDVTYPTLWLVKVA
[43]  WVPPIHFSKLVWCHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PLVQLRQELYVE---DYASIDWPAQRNNVCPDMMYHPSWLLHV
[44]  WVPPIHFSKLVWCHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PLVQLRQELYVE---DYASIDWPAQRNNVCPDMMYHPSWLLHV
[45]  WVPPIHFSKLVWCHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PLVQLRQELYVE---DYASIDWPAQRNNVCPDMMYHPSWLLHV
[37]  SLPMHFGRWVHTRGVYIPVSYLSLVKFSKCPMT-PLLEELRNEIYTK---PFDKINFSKRNRTVCGVDLYYPHSTTLNIA
[38]  WLPPIHFAKMWVHTRAIYLPGLCYTSANRVQCELD-PLLKEIRNEIYVPSQLPYESIKFGNQRNNVCGVDLYYPHSTTLNIA
[39]  WLPPIHFSKLVWCHCRMVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PLIESLRKEELYTV---NYDSINFADHRNTISDVLDFPHPTQILDR
[40]  WLPPIHFSRWVHTRAVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PLIESLRKEELYTV---PYSSINFSKHRNTTSPVDVYYPHPTQILDR
[41]  WVPPIHFWRWVHTRAVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PLIESLRKEELYTV---DWNKIDWAGNRNTIHPNDNYHPTAFNLNTA
[42]  WVPPIHFWRWVHTRAVYLPMSYLYGKRFVGPIT-PLIESLRKEELYTV---DWNKIDWAGNRNTIHPNDNYHPTAFNLNTA
[35]  WIPFSSRLWCHSRVVSIAFSYLYGKRFVGPIT-LLQLRQELYVE---PYGNIKWAKHRSNICAKDCYTPLSVYKVF
[36]  WFPPLSQGRVWCHSRVVSIAFSYLYGKRFVGPIT-LLQLRQELYVE---PYDQIQWDQHSNINCNLDYTPLSVYKVF
[33]  AFPFFHVRFYCHTRVYLVMSLQGAHATFDLG-PLRABELRELYGP---LAVPESFRQYRRLAETDAFEPNLFIRVA
[34]  WLPFFHSRFYCHTRVYLVMSLQGAHATFDLG-PLRABELRELYGP---LAVPESFRQYRRLAETDAFEPNLFIRVA
[29]  MLHITWIRGFSILTNEQVLSRILSNRILNDRIS-----
[27]  LEESVLAKLPLYGRPVVVAASLLATESQEGILNR-----
[28]  LTNMAIAGLVPKKSVALPFAAVVQSMYRFV-----GMPVVSYAVPAL
[31]  VYPTLESASERAGLLADRVPAGVPAMTPTSEWSK-----
[30]  IAAASYALDIEGLTFQATLLSESEKFKQKNWSKWEYPIYST-----MAFSLISEKVIKIEAGEDKLLKLSILP

```

QW5b

220 230 240 250 260 270 280 290

[01] IFDALDRALHGYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLIERQAGDGSWGGIOPPFYFALIALKILDMT-QHPAFIKGWEGLELYGV

[02] FFVALDKFLKAYNKWPIQPGRKSGEQKALEWILAHQEDAGCWGGIOPPFYFALIALKILDMT-DHPAFVKGFEGLIYGV

[03] AFQRIDKALHAYRKVAPRRRLRAAMNSAARWIERQENDGCWGGIOPPAVYSVIALYLLGYDLEHPVVRAGLESIDRFAV

[04] LFQRLDVALHTYRKVAPRRRLRAAMNSAARWIERQENDGCWGGIOPPAVYSVIALYLLGYDLEHPVVRAGLESIDRFAV

[05] LFLTLDEGFKLAESFNFIPIPREEGIKAAEKWIERQEATGDWGGIIPAMLNSMLALRSLGYDNDPIVERGLQALDNFAI

[06] LFLTLDEGFKLAESFNFIPIPREEGIKAAEKWIERQEATGDWGGIIPAMLNSMLALRSLGYDNDPIVERGLQALDNFAI

[07] VFIGLDRVFKLFETLNIHPLREQGLKAAEWWLIERQEASGDWGGIIPAMLNSMLALRSLGYDNDPIVERGLQALDNFAI

[08] LFLGLDKAFKFAENLNLMPIQEGLKAAEKWIERQEVTDWGGIIPAMLNSMLALRSLGYDNDPIVERGLQALDNFAI

[09] LFDVLDWGFKLAESLGAVPLREGLKAAERWVLERQEATGDWGGIIPAMLNSMLALRSLGYDNDPIVERGLQALDNFAI

[10] IFIGLDSLFLKLEQAKVVPFREQGLALAEKWIERQEVSGDWGGIIPAMLNSMLALRSLGYDNDPIVERGLQALDNFAI

[14] LFRSLDAILRVIEPLFPKSLRKRAIDTALAFSEERLNGEDMGAIYPPMANLVMYDALGKDENYPPRAVTRRGIDKLV

[15] LFLGLDKAFKFAENLNLMPIQEGLKAAEKWIERQEVTDWGGIIPAMLNSMLALRSLGYDNDPIVERGLQALDNFAI

[16] LFRGIDGILRVIEPHLPKLRERAIASALAFTEERLNGEDMGAIYPSMANLVMYDALGKDDHFPRAIARRAIDKLV

[17] IFGAIDRVLQKTDHFPKVRQRAIDKAVAWSERLNGEDGLGAIYPSMANSVLMYEVLYGPPDHPQVLIATIAIEKLV

[18] VFSGVDMLLRAVDGLFPKATREAVRAAVFVDERLNGEDGLGAIYPSMANSVLMYEVLYGPPDHPQVLIATIAIEKLV

[19] VFTLDAVVRMAEPLFRGLRQRAIERAREFTVRLNGEDGLGAIYPSMANSVLMYEVLYGPPDHPQVLIATIAIEKLV

[20] FFSALDKVLHKVEPYWPKNRAKAIHSCVHFVTERLNGEDGLGAIYPSMANSVLMYEVLYGPPDHPQVLIATIAIEKLV

[21] LIQ-IDKVLRVIEPAIHWAFDRAEKWARDFIERLNGEDGLGAIYPSMANSVLMYEVLYGPPDHPQVLIATIAIEKLV

[22] LLLYLERLGSKLEPLIPSFIRRRALKKAEQWIERLNGEDGLGAIYPSMANSVLMYEVLYGPPDHPQVLIATIAIEKLV

[23] AILALERFVRLEPLIPKAVRKATQKAFDWFTEARLNGEDGLGAIYPSMANSVLMYEVLYGPPDHPQVLIATIAIEKLV

[24] IFGLDKFARTLDRWMPKSLRQHAIRKAEAWFIPRMNGEDGLGAIYPPMVNCYEAMILLGYPKDHDPARKTCLRSIQKLV

[25] AFIIDRLLKRFNRFIPSAIHRKAMAEAEHWTSRMQSGGGIYPSMANSVLMYEVLYGPPDHPQVLIATIAIEKLV

[26] AFIIDRLLKRFNRFIPSAIHRKAMAEAEHWTSRMQSGGGIYPSMANSVLMYEVLYGPPDHPQVLIATIAIEKLV

[32] LFLGLDKFARTLDRWMPKSLRQHAIRKAEAWFIPRMNGEDGLGAIYPPMVNCYEAMILLGYPKDHDPARKTCLRSIQKLV

[12] LLSVDVKIIS----YPLSLHHKGYEETERFMKERIDENGLTLYSATASFYMIYALLALGHSLSQSMIQAIAITGTSYIW

[13] LVSDVKIIT----YPLSLHHKGYEETERFMKERIDENGLTLYSATASFYMIYALLALGHSLSQSMIQAIAITGTSYIW

[11] ILLHWKRVFH----APFAFQQLGLQTAKYMLDRIEKDGLTLYSATASYMIVYSLLSLGVSRYSPIIRRAITGKSLVT

[58] WASLYYAYEPIFMWPAKRLR-EKALDTVMQHHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWAED-PNSEAFKHLHPRILFDYLV

[59] WASLHHVYEPFLMRWPAKRLR-EKALQCVMQHHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWAED-PNSEAFKHLHPRILFDYLV

[56] WASLHKVVEPIFMWPAKRLR-EKSLRTVMEHHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWAED-PNSEAFKHLHPRILFDYLV

[57] WASLHKLLEPILMRWPGKRLR-EKALRTVIEHHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWAED-PNSEAFKHLHPRILFDYLV

[54] WATLHKFVEPVMFNWPGKRLR-EKAIKTAIEHHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWAED-PNSEAFKHLHPRILFDYLV

[55] WASLHKFLEPILMHWPGKRLR-EMAIKTAIEHHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWAED-PNSEAFKHLHPRILFDYLV

[53] WASLHKIVEPVMRWPGANLR-EKAIKTAIEHHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWAED-PNSEAFKHLHPRILFDYLV

[51] WATLHKFVEPVMHWPGKRLR-EKALNVMQHHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWAED-PNSEAFKHLHPRILFDYLV

[52] WATLHKFVEPVMRWPGKRLR-EKALDTVMQHHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWAED-PNSEAFKHLHPRILFDYLV

[50] WASLHKFVEPILMHWPAGKRLR-EKAVNTAMQHHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWAED-PNSEAFKHLHPRILFDYLV

[49] WTLHKVVEPILMRWPGKRLR-GKALKTVMQHHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWAED-PNSEAFKHLHPRILFDYLV

[48] WGTLHKVVEPALMHWPAGKRLR-ERALKVSMKHHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWAED-PNSEAFKHLHPRILFDYLV

[60] WGFLHFAVEPVLTRWPFKRLR-EKALKVAMEHHYEDENTRYICIGPVNKVLNMLCCWAED-PNSEAFKHLHPRILFDYLV

[61] WGVLNHNVEPVLTRSRPISLTLR-EKALKVAMDHVHYEDKSSRYLCTIGCVKVLCLLACWAED-PNGDAYKRHLARIPDYFW

[62] WGFLHHAVEPVLTRWPFKRLR-EKALKAAIGHVHYEDENSKYLCIGSVEKVLCLLACWAED-PNGEAYKHLARIPDYFW

[63] WGFLYHVEPFLNCPWPFKRLR-QKALETAINHVGYEDENSKYLCIGSVEKVLCLLACWAED-PNSEAYKHLARIPDYFW

[66] WDSLYIFTEPVLTRWPFKRLR-EKALQVTMKHHYEDENSKYLCIGSVEKVLCLLACWAED-PNGDYFRKHLARIPDYFW

[67] WDSLYIFTEPVLTRWPFKRLR-EKALQVTMKHHYEDENSKYLCIGSVEKVLCLLACWAED-PNGDYFRKHLARIPDYFW

[68] WDSLYIFTEPVLTRWPFKRLR-EKALQVTMKHHYEDENSKYLCIGSVEKVLCLLACWAED-PNGDYFRKHLARIPDYFW

[69] WDSLYIFTEPVLTRWPFKRLR-EKALQVTMKHHYEDENSKYLCIGSVEKVLCLLACWAED-PNGDYFRKHLARIPDYFW

[71] WDSLYIFTEPVLTRWPFKRLR-EKALQVTMKHHYEDENSKYLCIGSVEKVLCLLACWAED-PNGDYFRKHLARIPDYFW

[72] WDSLYIFTEPVLTRWPFKRLR-EKALQVTMKHHYEDENSKYLCIGSVEKVLCLLACWAED-PNGDYFRKHLARIPDYFW

[70] WDSLYIFTEPVLTRWPFKRLR-EKALQVTMKHHYEDENSKYLCIGSVEKVLCLLACWAED-PNGDYFRKHLARIPDYFW

[73] WDSLYIFTEPVLTRWPFKRLR-EKALQVTMKHHYEDENSKYLCIGSVEKVLCLLACWAED-PNGDYFRKHLARIPDYFW

[64] SDTLQNFSEPLTRWPNKLRREKALQVTMKHHYEDENSHYITIGCVKVLCLLACWAED-PNGDYFRKHLARIPDYFW

[74] WDTLYLLSEPLTRWPNKLRREKALQVTMKHHYEDENSHYITIGCVKVLCLLACWAED-PNGDYFRKHLARIPDYFW

[65] SGCLTKIVEPILNWWPANKLR-DRALTNLMEHHYDESKYVIGICPINKALNMLCCWVEN-PNSPEFQHLPRFHDYLV

[47] NGSLN-AYEKVHSHKWL- ----DKAIDYTFDHYEDEQTKYIDIGPVNKTVMMLCVWDRE-GKSPAFYKHADRLKDYLV

[46] NQAMY----GYEWLAGQLRARALDFALEQIARAEDEATHFICIGPVNKTVMMLCVWDRE-GKSPAFYKHADRLKDYLV

[43] YGLN----LYERFHSTSLR-KWAVQMLYEHIAADDCTKCSIGPISKTVMMLIRWSVDGSSPAFQEHVSRKIDYLV

[44] YGLN----LYERFHSTSLR-KWAIQLLYEHVAADRFTKCSIGPISKTVMMLIRWSVDGSSPAFQEHVSRKIDYLV

[45] YALLN----LYEHHSALHQR-RAVQKLYEHIVADRFTKCSIGPISKTVMMLIRWSVDGSSPAFQEHVSRKIDYLV

[37] NSLVV-FYEKYLNRNFIYSL- ---KKVYDLIKTELQNTDLSLAIAPVNOAFALVTLIEEGVDSEAFQRLQYRFKDALF

[38] NSILS-KWEA-VRPKWLLNWV----NKKVYDLIKTELQNTDLSLAIAPVNOAFALVTLIEEGVDSEAFQRLQYRFKDALF

[39] NWILE-KYFTYLRPSWLKLG----TRRAYELIKIEDQNTDYSICIGPVNAAMNTVCVYFHEGSSKAFQKHLQRLHDFMW

[40] NSILT-FYHTIFRFSWIKDMA----SKYAYKLEIYENKNTDFLCTIGPVNFSIHILAVYKWDGSSYAFKSHKRMADFLV

[41] NWLNVNIWNPVFRTKYLVEKA---EAWASELIDMEDENTDYSIDLAPVNAAMNTVCVYFHEGSSKAFQKHLQRLHDFMW

[42] NWFLVSNLWNPVLRNTNGIKERA---EKWTESEIDMEDENTDYSIDLAPVNAAMNTVCVYFHEGSSKAFQKHLQRLHDFMW

[35] AAVMS----LYEKRPVKFLR-RRALEVAWTHIAYDDESTHFICLGPVNKAFDMLITWIREGETSGRYLNHLNRLDDYFF

[36] AVLLK----LYEKWHIKSLR-RHALEVAWTHIAYDDESTHFICLGPVNKAFDMLITWIREGETSGRYLNHLNRLDDYFF

[33] ERVMG----WYDRVALPGLR-RAALKRCADLIDLDDANGYLTLSPVNGTLNALALFARG-ADREVIACVSGFEFYRF

[34] YDLA----RYERRPWKALR-QRALTLCFEQLREQRSTRYQGISVSGLLNCLAIFAHD-PRHPDLAPSLVSAVRRGLWLLDQQL

[29] -----DKNILNDKISDNRIILNDKISDNQIFNNRMLNAVELAIGKASNFISNQSDSEGYWED

[27] -----GIQYLLDQMEDGSWSEDIATSLAILGIMRLGGYEPFCQAGRWLITQKQYAT

[28] VAIGQVKFLEGGGCLPPWSLVRRAAIEPSMKVLRSMQPSGGYLEATPLTAFVVMSSLSASGRADHEVTQNGRLFRDMSL

[31] --ASEEAVRWLNDQNEDEGGWQAWTYRGIHSGSLTSDTAVAILMLLTHEIERRHESGGEYELVSAVRRGLWLLDQQL

[30] ELQNEDEGGWSLYKGYPSDVVVVYVYLKALEICNPRSEAAIKALEFMREISKRYENEIMRDHYLRNNYLSYILALAEYNAL

	300		310		320		330	
[01]	ELDYG	-----	GWMFQASIS	SPVWDTGLAVLAL	RAAGLPADH	----	DRLVKA	
[02]	HTSDG	-----	GWMFQASIS	SPVWDTGLTVLAL	RSAGLPEDH	----	PALVKA	
[03]	WRDDG	-----	ARMIEACQSP	VWDTCLATIAL	ADAGVPEDH	----	POLVKA	
[04]	WRDDG	-----	ARMIEACQSP	VWDTCLATIAL	ADAGVPADH	----	POLVRA	
[05]	ETVD	-----	CYRVQPCVSP	VWDTAWVIRAL	LDSGIAPDH	----	PAIVKA	
[06]	ETDN	-----	SYRVQPCVSP	VWDTAWVMRAL	VESGFVPDH	----	PAVVKA	
[07]	ETET	-----	EYRVQPCVSP	VWDTALVMRAM	VDSGVAPDH	----	PALVKA	
[08]	ENED	-----	SYRVQACVSP	VWDTAWVIRSL	VDSGISPSH	----	PAMVKA	
[09]	ETES	-----	TYRLQPCVSP	VWDTALTMRAL	VDSGLPPDH	----	PALAAA	
[10]	ETED	-----	SYAIQACVSP	VWDTAWVVRAL	AEADLGKDH	----	PALVKA	
[14]	IG	-----	DDEAYCQPCVSP	VWDTTLTAHAL	LEAGGDKAG	----	PAAKHG	
[15]	IG	-----	EEEAYCQPCVSP	IWDTSLTCHAL	LEAGGAEAA	----	QVREG	
[16]	IG	-----	EEEAYCQPCVSP	IWDTALTCHAL	QEVGGANAV	----	AKAKQG	
[17]	EK	-----	DDEAYVQPCVSP	VWDTALTSHAL	LEVGGTQAE	----	ANARAG	
[18]	IK	-----	DDEAYCQPCVSP	VWDTSLVAHAL	LETGEARAE	----	QAAERG	
[19]	IK	-----	DDEAYCQPCVSP	VWDTSLVAHAL	LEVGEPTI	----	AAARG	
[20]	LDGTEDQG	-----	DKEVYQPCVSP	IWDTALVAHAL	LEVGGDEAE	----	KSAISA	
[21]	PH	-----	AKGEYVQPCVSP	VWDTCLASHAL	QEQAGSAGD	----	RAVDQS	
[22]	NEGE	-----	DITWCQPCVSP	VWDTVLAHAL	QEDERAD	----	NGPVRHA	
[23]	FQG	-----	DSEVYQPCVSP	IWDTALTSLTL	QEVARHTADLR	LDAA	SKG	
[24]	HRDD	-----	GSAYCQPCVSP	VWDTAWSAMAL	IHSGDDTAT	----	QTAARA	
[25]	HRTPEADSPRTGGPCIDSGTSAAFADPSPHAAADGRGNSSICQPCNSPIWDTCLSLSALMEAGMPASH	----	PAKQA					
[26]	HRTPEADSPRTGGPCIDSGTSAAFADPSPHAAADGRGNSSICQPCNSPIWDTCLSLSALMEAGMPASH	----	PAATQA					
[32]	EDPAH	-----	GKWMQPSVSP	VWDTFLMIRAVADAK	TTDDAD	----	KLIVKJ	
[12]	KMER	-----	GNHLQNSPSTV	WDTALLSYAL	QEAQVSKDN	----	KMIQNA	
[13]	KMER	-----	GSHLQNSPSTV	WDTALLSYAL	QEAQVSKAS	----	KVIHNA	
[11]	KCNG	-----	IPYLENSTSTV	WDTALISYAL	QKNGVTETD	----	GSVTKA	
[58]	IAEDG	-----	MKMQGYNGSQL	WDTTFAVQAI	IIST--NIAEE	-YGPT	RKA	
[59]	IAEDG	-----	MKMQGYNGSQL	WDTTFAVQAI	MST--KLAEE	-YGPT	RKA	
[56]	IAEDG	-----	MKMQGYNGSQL	WDTTFAVQAI	IIST--NLAEE	-YGPT	RKA	
[57]	IAEDG	-----	MKMQGYNGSQL	WDTTFAVQAI	IIST--KLSEE	-FGPT	RKA	
[54]	VAEDG	-----	MKMQGYNGSQL	WDTTFAVQAI	IIST--NLIDE	-FGPT	RKA	
[55]	IAEDG	-----	MKMQGYNGSQL	WDTTFAVQAI	IIST--NLIEE	-YGPT	RKA	
[53]	IAEDG	-----	MKMQGYNGSQL	WDTTFAVQAI	IIST--NLVEE	-YGPT	RKA	
[51]	VAEDG	-----	MKMQGYNGSQL	WDTTFAVQAI	TAT--GLIDE	-FAPTE	KLA	
[52]	IAEDG	-----	MKMQGYNGSQL	WDTTFAVQAI	VAT--GLIEE	-FGPT	KLA	
[50]	IAEDG	-----	MKMRYNGSQL	WDTTFAVQAI	IIST--DLFEE	-FGLA	TKA	
[49]	IAEDG	-----	MKIQGYNGSQL	WDTTFAVQAI	IAT--GFSNE	-FGPT	RKA	
[48]	VAEDG	-----	MKMQGYNGSQL	WDTTFAVQAI	IIST--NLLDD	-CGPT	RKA	
[60]	VAEDG	-----	LKMQSFG-COMWDAAF	FAIQAILSS--NLAEE	-YGPT	RKA		
[61]	VAEDG	-----	LKMQSFG-COMWDAAF	FAIQAI FSS--NLTEE	-YGPT	RKA		
[62]	VAEDG	-----	LKIQSFG-COMWDAG	FAIQAILSC--NLNEE	-YWPTE	RKA		
[63]	IAEDG	-----	MKIQSFG-COMWDAAF	FAIQAILLAC--NVSEE	-YGPT	RKA		
[66]	VAEDG	-----	LKMQSFG-SQEWDT	GFIAQAILLAS--NLTDE	-IGPT	LARG		
[67]	VAEDG	-----	LKMQSFG-SQEWDT	GFISIQAILLDS--DLTSE	-IGPT	MKG		
[68]	MSEDG	-----	MTMQSFG-SQEWDT	GFIAQAILLAA--NLNDE	-IEPAL	AKG		
[69]	ISEDG	-----	MTMQSFG-SQEWDT	GFIAQAILLAT--NLIEE	-IKPAL	AKG		
[71]	VSEDG	-----	MTMQSFG-SQEWDT	GFIAQAILLAT--NIIEE	-IGPT	FAKG		
[72]	VSEDG	-----	MTMQSFG-SQEWDT	GFIAQAILLAT--NLVEE	-IAPT	AKG		
[70]	VSEDG	-----	MCMQSFG-SQEWDT	GFIAQAILLAT--NLVDE	-LGPT	AKG		
[73]	VSEDG	-----	MTLHSGF-SQEWDT	GFIAQAILLAT--NLIED	-VGPT	TKA		
[64]	VAEDG	-----	MKMQSFG-CQLWDT	GFIAQAILLAS--NLPDE	-TDDAL	KRG		
[74]	MAEDG	-----	MKMQSFG-SQSWDAAL	AMQAILLSC--NITRE	-IGSVN	NSG		
[65]	MAEDG	-----	MKAQVYDCHS	WELAFILHAYCST--DLTSE	-FIPT	RKA		
[47]	LSFDG	-----	MKMQGYNGSQL	WDTTFAVQAI	QAFMES--GIANQ	-FQDCM	KLA	
[46]	EAADG	-----	IKMNGYNSSEL	WDTSFVAVQAAVAT--GEVER	-CRFME	AEA		
[43]	LGLDG	-----	MKMQGTNGSQL	WDTSFVAVQAIL	LEAGHHRPE	-FLPCL	QKA	
[44]	LGLDG	-----	MKMQGTNGSQL	WDTSFVAVQAIL	LEAGHHRPE	-FLPCL	QKA	
[45]	MGLDG	-----	MKMQGTNGSQL	WDTSFVAVQAIL	LEAGHHRPE	-FSSCL	QKA	
[37]	HGPQC	-----	MTIMGTNGVQ	IWDCAFAYQYFFV	VAGLAERPE	-FYNTI	VSA	
[38]	HGPQC	-----	MTVMGTNGVQ	WDAAFVQYFFMT	GLVDDPK--YHDM	IRKS		
[39]	VQPEC	-----	MLMRGTNGLO	VWETSFTLOAL	VESGLYEKEA	-FKPDI	AKA	
[40]	ISKKG	-----	MMNGTNGVQ	IWDTSFVAVQAIL	VESGLAEDPE	-FKDHI	AKA	
[41]	VNAEC	-----	MLCNGTNGVQ	WDTAFVAVQAIM	DAGLTEDPR	-WRPML	IKS	
[42]	VKDEC	-----	MLVNGTNGVQ	WDTSLVAAFC	EAGLHHEDR	-WQPM	ERRA	
[35]	MGPEC	-----	LRMSGYNGSQL	WDTSFVAVQAIL	CAC--NMELL	-YPEEM	ALA	
[36]	MGPEC	-----	MRVCGYNGSQL	WDTSFVAVQAIL	CAC--NMELL	-YPQMS	LA	
[33]	DDPER	-----	GLRYSGGSTRT	WDTGFAL	EALANP	-AVASV	-YRDV	VHRG
[34]	EDEAE	-----	GLRYVGARSNA	WDTAFVAVQAIL	AELP	-ELDEE	-AKHA	SRA
[29]	FYIPC	-----	---	MGKSSQV	TAYIAYSLSRL	PNTDKS	----	VOKA
[27]	G	-----	---	AWPAFDQLKN	AMGWAVCI	AGETGNGWRGN	----	SWEPG
[28]	PDGS	-----	---	WPIDTNLAN	WATSLATTAL	TMD	----	PDDRS
[31]	EDGWS	-----	---	RKREEAREGAP	WHTRAAVAAL	LMALERRDLLN	LDSD	AVDR
[30]	TEEEK	-----	---	EKAIEI	IESSFWGNL	GKQPKTVA	----	LAIRT

QW5a
YDPXDdTAV

340 350 360 370 380 390 400

[01] GEWLLDRQI--TVPGDWAVKRPNLKPGGFQFDNVVYDIDDTAVVVWALNLTLLRLPD-----ERRRRDAMTKGFRWIV
 [02] GEWLVSKCI--LKDGDWVKVRRKAKPGGWAFFPHCENYDIDDTAMVVLALNGIQLPD-----EGKRRDALTRGFRWLR
 [03] SDWMLGEQI--VRPGDWSVKRPLPPGGWAFEFHNDNYDIDDTAEVVLALRRVRHHD-----PERVEKAIIRGVRWNL
 [04] ADWMLGEEI--VRPGDWAVKRPOLPPGGWAFEFHNDNYDIDDTAEVVLALRRVKHHD-----PERLDNAIRRGVRWNL
 [05] GEWLLQKCI--LDYGDWVKNRQKPGGWAFFEFENRFYDIDDTAVVVMALHAAKLPN-----EQLKQKACDRALQWVA
 [06] GEWLLQKCI--LDYGDWVKNRQKPGGWAFFEFENRFYDIDDTAVVVMALHAAKLPN-----EKIKQAAIARAVNWIA
 [07] GEWLLSKCI--LDYGDWHIKNKKGRPGGWAFFEFENRFYDIDDTAVVVMALHAAVTLPN-----ENLKRRAIERAVAWIA
 [08] GQWLLQOCI--LDYGDWVFKNFKGKPGGWAFFEFMNRFYDIDDTAVVVMALDVLVLPD-----EDLKGAIAIRGMEWIA
 [09] GTWLLKQCI--LDYGDWVKNRTPGPPGGWAFEFDNRFYDIDDTAVVVMALDAVRLAD-----ETAKGQAIARAVCWVA
 [10] GQWLLDKCI--LTYGDWQIKNPHGEPGWAFFFDNNFYDIDDTAVVVMALQGITLTPD-----BERKQGAINKALQWIA
 [14] LDWLLPKQI--LEVKGDWAVKRPDVRPGGWAFFQYNNAYDIDDTAVVVMAMDRMRREH---G-VTGYDSAIDRGREWIE
 [15] LDWLLPKQI--LDLKGWAVKAPNVRPGGWAFFQYNNAYDIDDTAVVVMALDRARRDQ---P-SAAAYATAIARGREWIE
 [16] LDWLLKPROV--LDVKGWAVKAPNVRPGGWAFFQYNNAYDIDDTAVVVMAMDRMRREH---G-SKEYATAIARGREWIE
 [17] LDWLLKPCI--LDIKGDWAETKPNVRPGGWAFFQYNNAYDIDDTAVVVMAMDRMRREH---G-SKEYATAIARGREWIE
 [18] LAWLLRPLQI--LDVKGWAVKAPNVRPGGWAFFQYNNAYDIDDTAVVVMAMDRMRREH---H-SEVDREAIARREWIV
 [19] LDWLLPKQI--LELRGDWVRRPNVRPGGWAFFQYNNAYDIDDTAVVVMAMDRMRREH---R-SNRYATAIARGREWIE
 [20] LSWLLKQCI--LDVKGWAVKRPDLRPGGWAFFQYNNAYDIDDTAVVVMAMDRMRREH---DL-HDDFEESKARAMEWTI
 [21] NAWLLREROV--LDVVGWVKSNRGHLRPGGWAFFQYNNAYDIDDTAVVVMALARSKEDE-----ANREAIARAEEWII
 [22] LDWLLVPLQI--LDQPGDWRNSRDLRPGGWAFFQYNNAYDIDDTAVVVMALARSKEDE-----DYRSTITRAADWIA
 [23] LKWLASKQI--LDKAPGDWRVNRAGLEGGGWAFFQYNNAYDIDDTAVVVMALARSKEDE-----SFDNTRIRGANWIA
 [24] GDWLVQRQI--LDCRGDWEAQAPQAAPGGWAFFQYNNAYDIDDTAVVVMALARSKEDE-----GQ-PGQAFNTRADWML
 [25] VEWLLSQCI--FSPGDWSLKAPDLEGGGWAFFQYNNAYDIDDTAVVVMALARSKEDE-----NGLYRDRVARGVNWIL
 [26] VEWLLSQCI--LSPGDWSLKAPDLEGGGWAFFQYNNAYDIDDTAVVVMALARSKEDE-----NERYDRIRAGVNWIL
 [32] VDWVLAQCI--IDDDHIGDWRIYRPIPAAGGFQYNNAYDIDDTAVVVMALARSKEDE-----VNDRIIRKAAWTL
 [12] TAYLLKQCI--TKKADWSVHAPALTPGGWGFSDVNTTIDIDDTAVVVMALARSKEDE-----NIDNAWKGGNWTI
 [13] SAYLLRQCI--TKKADWSVHAPALTPGGWGFSDVNTTIDIDDTAVVVMALARSKEDE-----NVDTAWKRAVNWIK
 [11] ADFLLRQCI--TKIADWSVKNPNSVPGGWFSDVNTTIDIDDTAVVVMALARSKEDE-----HSPAWERGVSWIL
 [58] HEYIKDSQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--KSIDEEQIYDAVNVIL
 [59] HKYIKDSQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--KSIDEEQIYDAVNVIL
 [56] HTFMKNSQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [57] HTYIKNSQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDARRLYDAVNVIL
 [54] HAFIKNSQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [55] HTYIKNSQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [53] HSFVKNQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [51] HNFIKNSQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [52] HGYIKKTQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [50] HGYIKKTQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [49] YKYVKSQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [48] HIYIERSQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [60] HNFVKASQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [61] HEFVKASQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [62] HEFVKASQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [63] HDFIKASQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [66] HDFIKASQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [67] HDFIKASQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [68] HDFIKASQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [69] HDFIKASQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [71] HDFIKASQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [72] HDFIKASQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [70] HDFIKASQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [73] HDFIKASQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [64] HNYIKASQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [74] HDFIKASQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [65] HEFVKASQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [47] GHYLLDISQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [46] ARFLIANSQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [43] HEFLRLSQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [44] HEFLRLSQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [45] HEFLRLSQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [37] YKFLCHASQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [38] YLFLVRSQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [39] LEFLDRQCI--IRTQYE--GSG--YRNSLGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [40] LDFLDKCCI--IQKNC--DQKCYRHRKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [41] LEFLDQCI--IRENVK--DQKCYRHRKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [42] LEFLDQCI--IRENVK--DQKCYRHRKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [35] HHYVDVAQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [36] HHYVDVAQVLEDCPGLDQSWYRHSKGAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [33] YRFLAAHQMS--KSVAGRDPSPDARGCWCLDGGHAWPFSTADHGWPISDCTAEGKAVLLLSKLPSELVIG--EPLDAKRLYDAVNVIL
 [34] HAFLDQAQMT--AELADYREAWRDPALGCGWGFSDVNTTIDIDDTAVVVMALARSKEDE-----EALGDARLIQAEFMI
 [29] IVWLL-----HTKFSGGWGYHQN--CLPDAVSTANVRLLAYFKKENLLTQ--ENFVYLLHEFADLLA
 [27] VAWLKQACN-----ADGSYG--STPPYTHEDLDTAVALLIGLYQVGAEN-----PLGVQLLK
 [28] WSTNELIQWQRGCQYQERHPFTGADPGGWFDTLTSVVDADDTAVVVMALARSKEDE-----PLGVQLLK
 [31] IKSALIRGVSWLLERQNPDGWSYGLMCOEYSADTQAYILSLTIDVYLLKADRLGLHVD-----RDRIINAIRRGIEWLF
 [30] LVALGISPNDKI--IKENLEWLMKMEHCGWGFVFTSLVWVYFAPYPTETLDVFTSLLP-----VVGKEKLGKTEFIIK

	470	480	490	500	510	520	530
[01]	VIRRAVEYLK-----	REOKPDGSWFG	RWGVNLYY	YGTGAVVSALK	-AVGIDTREP	Y-----	IQKALDWVEQHCPNDGG
[02]	VIRKAVEYLK-----	AQORPDGSWFG	RWGVNLYY	YGTGAVVPELK	-AVGVDMREPW	Y-----	VQKSLDWLVEHONEDGG
[03]	-TRRGIQWLL-----	DAQETDGSWFG	RWGVNLYY	YGTGSVIPALT	-AAGLPTSHPA	Y-----	IRRAVRWLESVONEDGG
[04]	-TRRGIQWLL-----	SACEANGSWFG	RWGVNLYY	YGTGSVVPALV	-AAGLPASHPA	Y-----	IRRAVWLETVCNDDGG
[05]	NLERALTYLL-----	NBOEAGCWF	RWGVNLYY	YGTSGVLSALA	-LINPQKYQRH	Y-----	IQQGATWLVGCNPDGG
[06]	NLERSLTYLL-----	REOETEGCWF	RWGVNLYY	YGTSGVLSALA	-LIDPQRHKLS	Y-----	TERGAWLLGCNLDGG
[07]	ALDRALAYLR-----	NBOEPEGCWF	RWGVNLYY	YGTSGVLTALS	-LVAPRYDRWR	Y-----	IRRAEAWLMQCNADGG
[08]	RVKRGIDFLV-----	REOEEEGCWF	RWGVNLYY	YGTSGVILALA	-VMARESHRGY	Y-----	TERGASWLVGCNNDGG
[09]	GAQRALDYLR-----	RTOEPEGCWF	RWGVNLYY	YGTSGVLSALA	-AFAP-AERTA	Y-----	TERAAAWLRGCNNDGG
[10]	RVERGLTYLL-----	QBOEQDGSWFG	RWGVNLYY	YGTSGALSALA	-IYDAQRFAPQ	Y-----	IKTAIAWLLSCNADGG
[14]	HVADGVAYLR-----	KTOHPEGSWYGR	WGMNLYY	YGTWSVLCALN	-MAGVRHDDPM	Y-----	IRKADWLASICNKDGG
[15]	AVARGVAYLR-----	KTOLPDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWAVLCAIN	-AAGVDHQDPA	Y-----	IRKAVAWLASICNADGG
[16]	AVAEGIAYLR-----	RTOHAEGSWYGR	WGLNLYY	YGTWSVLCALN	-AAGIDHQDPM	Y-----	IRKAVEWLVSTCSWDGG
[17]	ALDRGVTYLL-----	NDOEKDGSWYGR	WGMNLYY	YGTWSVLCALN	-AAGVDQSPPE	Y-----	IRKAVAWLIRICNPDGG
[18]	PAQRAFAYML-----	KBOEPDGSWYGR	WGLNLYY	YGTWTALCSLN	-AAGMPHDDPR	Y-----	MKRAARWLLSTONEDGG
[19]	PAARALDYLL-----	DBOEADGSWFG	RWGVNLYY	YGTWSALCGLN	-AAGIGTDAPE	Y-----	MTRAAQWLLSTONEDGG
[20]	-MKAADVYLL-----	KBOEEDGSWFG	RWGVNLYY	YGTWSALCGLN	-VAALPHDHLA	Y-----	VQKAAWLVKTIQONEDGG
[21]	VVARGLDYLL-----	REOEDGSWFG	RWGVNLYY	YGTWSALNAFN	-AVEWDMTDP	Y-----	ICKAVDWLKSRCRDDGG
[22]	TVKRGITFLF-----	NBOEPSGAWFG	RWGVNLYY	YGTWSVLEALK	-LARVDHHDQA	Y-----	VKRAVQWLKSVCRADGG
[23]	VLERTIDYLR-----	REOEDGSWFG	RWGVNLYY	YGTWAGVLLAYE	-GRRVPNDPDS	Y-----	VRRVAWLLSICQREDGG
[24]	GLRACIDYLR-----	TTQPPDGSWFG	RWGVNLYY	YGTWSALSLA	-LAGEDLRQPY	Y-----	LRKSVDWLRTICHPDGG
[25]	PLAQGIGFLR-----	SKOEGSGAWFG	RWGVNLYY	YGTWSVLSGLR	-QAGEDMQOPY	Y-----	IRRAVGWLLSICNHDGG
[26]	PLARGIGFLR-----	SBOEENGAWFG	RWGVNLYY	YGTWSVLSGLR	-QAGEDMQOPY	Y-----	IRKAVGWLLSICNHDGG
[32]	ACDRGLGYLL-----	GSCEAFGSGWYGR	WGVNLYY	YGTSAALCALAYFADR	KGVGRK	Y-----	MAAGADWLLSRQNPDGG
[12]	QIQRAINWLM-----	NVQEEENGSWYGR	WGVNLYY	YGTWAVLTGLR	-SLGIPSSNPS	Y-----	LTRAASWLEHTICHDGG
[13]	QKQSAINWLM-----	NVQEEENGSWYGR	WGVNLYY	YGTWAVLTGLR	-SLGIPSSDPS	Y-----	VKRAALWLEHTICHDGG
[11]	HTQRAVWLF-----	EHQEQNGSWYGR	WGVNLYY	YGTWAALTGMH	-ACGVDRKHPG	Y-----	IQKALRWLLSTONDDGG
[58]	CHAKAAEFIE-----	NIQASDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	RTYKN	Y-----	CSSIHKACDYLKSELASGG
[59]	CVAKAADFIE-----	SIQATDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	RRYDN	Y-----	CSSLRKACDYLKSELASGG
[56]	STEKAAEFIE-----	KIQSSDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVTA	CRTFSS	Y-----	CASIRKACDYLKSELASGG
[57]	CHAKAAEFIE-----	KIQAKDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	GRNFNN	Y-----	CSSLRKACDYLKSELASGG
[54]	CHKAVAFIE-----	KIQASDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	GNFSN	Y-----	CLSTRKACDYLKSELASGG
[55]	CHKAAEFIE-----	KIQASDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	GNFSN	Y-----	CSSLRKACDYLKSELASGG
[53]	CHKAVAFIE-----	SIQAADGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CKTLKN	Y-----	SPHVAKACDYLKSELASGG
[51]	CINKAANFIE-----	SIORSDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	GRTFKS	Y-----	SPAIRKACDYLKSELASGG
[52]	CISKAASFIE-----	GIQKSDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	GRTFKN	Y-----	SPAIRKACDYLKSELASGG
[50]	CIRKARSFIE-----	KIQOLADGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	GRTYET	Y-----	SSCIRKACDYLKSELASGG
[49]	CITKGVQFIE-----	KTOEHDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	ISGCKYEN	Y-----	SHSTRKACDYLKSELASGG
[48]	CILKATRYIE-----	NIORPDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CKTYQN	Y-----	CSSIRKACDYLKSELASGG
[60]	CISKAIQYIE-----	ATQNPDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CKNYHN	Y-----	SPTLRKACDYLKSELASGG
[61]	CISRAVYVE-----	DTQESDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CKNYHN	Y-----	CPALCKACDYLKSELASGG
[62]	SIYRGIQYIE-----	DVQEPDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CRNYKN	Y-----	CPAIRKACDYLKSELASGG
[63]	CLSKAINYIE-----	NTQNPDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CKNYHN	Y-----	SPSLRKACDYLKSELASGG
[66]	FTKNAQFLQ-----	VIQMPDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CKTYNN	Y-----	CLAVRRADVFLLRQNDGG
[67]	FTNNAVRFLE-----	DTQMPDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CKTYNN	Y-----	CAAVRQACDYLKSELASGG
[68]	FTSEAVRFIE-----	DIQADGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CKTYTN	Y-----	CAATRQAVKFLITQREDGG
[69]	FTFNAVRFLE-----	DTQTEDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CKTYTN	Y-----	CAATRQAVKFLITQREDGG
[71]	FTTNAVRSLE-----	DTQADGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CKTYTK	Y-----	CAATRQAVKFLITQREDGG
[72]	FTNNAVRFLE-----	DTQADGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CKTFAN	Y-----	CAATRQAVKFLITQREDGG
[70]	FTSEAVRFLE-----	DTQADGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CKTYAN	Y-----	CAATRQAVKFLITQREDGG
[73]	FTNNAVRFLE-----	YKQSDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CKTYDN	Y-----	CAATRQAVKFLITQREDGG
[64]	STEKAVQFIQ-----	DNQTPDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	GETYND	Y-----	CLAMRNGVHFLITQREDGG
[74]	FTNKAVFLQ-----	DIQLPDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CKTYEN	Y-----	CEAVRQACDYLKSELASGG
[65]	CIEEAVVFIQ-----	NSQNKDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CKTYDN	Y-----	CASIRKACDYLKSELASGG
[47]	STARGVKFIK-----	SIQRQDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CEPLTS	Y-----	PSIVKACDYLKSELASGG
[46]	ATSRGAEFIR-----	RAQREDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	VSPG	Y-----	DMVLRRAAFLRSHCRSDGG
[43]	TLNQGLDFCR-----	RKORADGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CHTYQDGA	A-----	CAEVAQACDYLKSELASGG
[44]	TLNQGLDFCR-----	KKORADGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CHIQNRT	A-----	CAEVAQACHFLRSCMADGG
[45]	TLTQGLEFCR-----	RQORADGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	QTYRDGT	A-----	CAEVSRAQACDYLKSELASGG
[37]	RTIRIAEFIK-----	KSQ-LPDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	HTVGETYEN	Y-----	SSTVRKACDYLKSELASGG
[38]	FTSSAIQYIL-----	DSQDNDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	HTVGLDYES	Y-----	SSAVKGCDFLISKCLPDGG
[39]	THENALEYVV-----	KMORPDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	GRYEN	Y-----	CPVQKACDYLKSELASGG
[40]	SVKNAIQFIK-----	ESQRPDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	ESLSCVDFYEN	Y-----	SFHSRACDYLKSELASGG
[41]	FTTRAVKWKI-----	SNQKPHGSGWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	ESLSCVGETYEN	Y-----	SRYAKGCDFLISKCLPDGG
[42]	FTKRAVWIRGSSHLHLS	SGGRMAGWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	ESLSCVGETYEN	Y-----	SDYAKRACDYLKSELASGG
[35]	ALRDGVKCM-----	ANORTDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	ESLSCVGETYEN	Y-----	HPTCVRLVNFLLSHQNTDGG
[36]	ATREGLKFVL-----	SLORPDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	CISREIPDMAN	Y-----	HPSCVRLIDFLSHQNTDGG
[33]	ATNRGARFLL-----	SRORPDGAFPGAWGV	LYYGTWFAVGLVAAC	ESLSCVGETYEN	YAPSH	Y-----	RALQRAANWLLIATCKRDGG
[34]	ATRKAREFLR-----	SRQLDGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	ESLSCVGETYEN	Y-----	PVLQAAAGWLLIATCKRDGG
[29]	ETSKAREFLIS-----	RONAGYWDYVWWD	CRITYGTSLACN	FLKQLGEIDPV	Y-----	Y-----	KKATSWLKSIFVPSKGG
[27]	SVYRGLGWLS-----	AQDDAQGAFTSSWYEGS	LYSTAQAL	ELFSSKWFNWHQLYL	TRDILEARCKAINFIVES	QOEDGG	
[28]	AVQGRGLRFLR-----	KNQADGSWYGR	WGVNLYY	YGTWFAVGLVAAC	ESLSCVGETYEN	Y-----	HDAISRGLYLLINSQNDGG
[31]	ETPGGKRLIS-----	DLVTDPEYNLHATV	EWLVSQR	YR	Y-----	Y-----	GTEHPWYGAWPWPARD
[30]	NVYTVLSELRG-----	KEVELRTNDPKL	QIVAESIEGT	VNASVVRIS	SELLAVP	Y-----	DVGDYIFVAP--VGR

	540	550	560	570	580	QW1
[01]	WGEDCR	SYEDP--AYAGKGA	STPSQTAWALMALIACGRA	-----	-----	ESEAARCVQYLVETORPD
[02]	WGEDCR	SYDDP--RLAGQGV	STPSQTAWALMALIACGRV	-----	-----	ESDAVLRGVTYLHDTORAD
[03]	WGEDLR	SYRYVR--EWSGRGA	STASQTGWALMALLAGER	-----	-----	DSKAVERGVAVLAATOR
[04]	WGEDLR	SYPEAA--EWSGKGA	STASQTGWALLALLAGER	-----	-----	ESKAVERGIEWLAQTORPD
[05]	WGETCF	SYNDP--SLKGGQD	STPSQTAWALIGLLIAGEATGNF	-----	-----	AHDAIERGINHLVSTQCPD
[06]	WGETCR	SYDDP--SLKGGKGS	STASQTAWALIGLLIAGEATGKL	-----	-----	AVKAIEQIGYLMATQCPD
[07]	WGETCWS	SYHDP--SLKGGKGS	STASQTAWALIGLLIAGEATGDY	-----	-----	ATEAIERGTAYLLETORPD
[08]	WGES	CWSYNDP--SLKGGKGS	STASQTAWALIGLLIAGEGTGNF	-----	-----	ARDAIDGCVGYLVSTONDD
[09]	WGETCG	SYVDR--TLMGQGP	STASQTAWALLGLIDASRVARFS	-----	-----	DSSALERGLAYLVETOKAD
[10]	WGETCB	SYKKN--QLKGGQNS	STASQTAWALIGLLDALKYLP	SLGQDA--K	-----	LTTAIEGCVAFVLVQGTCPK
[14]	WGEDTV	SY--RLDYKGWAA	STASQTAWALLALMAAGEVD	-----	-----	HPAVARCVVEYLIAATONEK
[15]	WGEDGV	SY--RLDYRGYETAP	STASQTAWALLSILMAAGEVD	-----	-----	HPAVARCVVEYLKGTOTEK
[16]	WGEDAI	SY--RLDYSGYEQAP	STSSQTAWALLGLMAAGEVE	-----	-----	HPAVARCVNYLKNAOTEN
[17]	WGEDAS	SY--KLN--PEFEPGY	STASQTAWALLALMAAGEVD	-----	-----	DPAVARCVNYLMRTQGD
[18]	WGE	GGESY--KLDYHGHERAP	STASQTAWALLMGLMAAGEVN	-----	-----	HEAVARCVAYLQREOREH
[19]	WGES	GDSY--KLEYRGYEKAP	STASQTAWALLMGLMAAGEVD	-----	-----	HPALVRCVGYLRTQASH
[20]	WGENCD	SY--ALDYSGYEPMDS	STASQTAWALLGLMAAGEAN	-----	-----	SEAVTKGINWLAQNODEE
[21]	WGEDCAT	Y--WKERRSVSKA	STPSQTAWALLGLMAAGEVD	-----	-----	SPEVERCIRYLLLEAPRGG
[22]	WGETNDS	YLDSELAG--QLETS	STFQTAWALLGLMAAGEVG	-----	-----	STAVRNCTIDYLRTQSA
[23]	WGEDNF	SYHDP	SYRG--RFHTSTAFQTGWALLALMAAGEVG	-----	-----	SPEVQACVGYLRTQASH
[24]	WGETNDS	YIDPHLAGTNAGI	STPHSTAWALLAQLMAAGEVE	-----	-----	SDSVRRCITAFLLACQOTD
[25]	WGETCY	SYDDPSLAG--QGES	STPSQTAWALLGLMAAGDVH	-----	-----	SLAVRRCVRYLLDHQONQW
[26]	WGETCY	SYDDPSLAG--KGA	STPSQTAWALLGLMAAGEVN	-----	-----	SLAVRRCVRYLLDHQONQW
[32]	WGES	LLESYDNK--ALAGRGR	STPSQTAWALLGLEEDPR	-----	-----	GEVVEACVNWLLRHOVTS
[12]	WGES	CHSSVEKR--FVTL	PFSTPSQTAWALLDALISYYDTE	-----	-----	TPAIRKCVSYLLSNPYVNER
[13]	WGES	CQSSVEKR--FVTL	PFSTPSQTAWALLDALISYYDKE	-----	-----	TPVIRKCVSYLLSNPYVNEK
[11]	WGES	CKSAEIKT--YVPL	HRGTIVQTAWALLDALLTYENSE	-----	-----	HPSVVKCMQYLLTSSSSHSADS
[58]	WGES	YLSQDKVYTNLKDN	RPHIVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAARILINSOMEN
[59]	WGES	YLSGQNKVYTNIKDD	RPHIVNTGWAMLLSLIDAGQSERDPT	-----	-----	PLHRAARILINSOMDD
[56]	WGES	YLSQCNKVYTNLEGN	RSHVVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAAKLLINSOMEN
[57]	WGES	YLSQCNKVYSNIVGN	TSHVVNTGWAMLLALIDAGQAERDPA	-----	-----	PLHRAAKLLINSOCEN
[54]	WGES	YLSQCNKVYSNLEGN	RSHVVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAAVCLINSOLEN
[55]	WGES	YLSQCNKVYSNVE	SNRSHVVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAAVYLINSOMEN
[53]	WGES	YLSQDKVYTNLDGN	RSHVVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAARYLLINAOMEN
[51]	WGES	YLSQDKVYTNLE	GKHAHAVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAAKVLLINLOSED
[52]	WGES	YLSQDKVYTNLE	GKRAHAVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAAKVLLINLOSED
[50]	WGES	YLSQCNKVYTNLE	GNRAHAVNTGWAMLLALIDAGQGERDPK	-----	-----	PLHRAAKVLLINMOMEN
[49]	WGES	YLSQCKVYTNLE	GNRAHAVNTGWAMLLALIDAGQAQRDAE	-----	-----	PLHRAAKVLLINMOMEN
[48]	WGES	YLSQCKVYTHLE	GGRSHIVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAAKVLLINMOMEN
[60]	WGES	YLSQNKVYTNLE	GNRNLVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PIHRCIKLLINSOMED
[61]	WGES	YLSQNKVYTNLE	GNRNLVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PIHRCIKLLINSOMED
[62]	WGES	YLSQNKVYTNLE	GNRNLVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PIHRCIKLLINSOMED
[63]	WGES	YLSQNKVYTNLE	GNRNLVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PIHRCIKLLINSOMED
[66]	WGES	YLSQPKKVIYVPLE	GNRNLVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAAKLLINSOLEE
[67]	WGES	YLSQPKKVIYVPLE	GNRNLVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAAKLLINSOLEE
[68]	WGES	YLSQPKKVIYVPLE	GNRNLVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAAKLLINSOLEE
[69]	WGES	YLSQPKKVIYVPLE	GNRNLVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAAKLLINSOLEE
[71]	WGES	YLSQPKKVIYVPLE	GNRNLVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAAKLLINSOLEE
[72]	WGES	YLSQPKKVIYVPLE	GNRNLVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAAKLLINSOLEE
[70]	WGES	YLSQPKKVIYVPLE	GNRNLVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAAKLLINSOLEE
[73]	WGES	YLSQPKKVIYVPLE	GNRNLVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAAKLLINSOLEE
[64]	WGES	YLSQSEQRVYI	PSSEGNRNLVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAAKLLINSOLEE
[74]	WGES	YLSQSEQRVYI	PSSEGNRNLVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLHRAAKLLINSOLEE
[65]	WGED	YLSQSDNGEYID--	SGRPNVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	PLYNAAARQLMNMOLFT
[47]	WGES	YKSNVTKEYVQ--	HETSOVNTGWAMLLALIDAGQAERDPT	-----	-----	CIERCIKFLIQRQYPN
[46]	WSE	VBSRCRQ--RWIE	GTHGAVNTSWALLTLASVQ--EONSE	-----	-----	AVRRGIRWLLDRQOED
[43]	WGED	FESCEQRRYVQ--	SARSQVHSTCWALLGLMAVR--HPDIT	-----	-----	AQERCIRCLLKGKOLPN
[44]	WGED	FESCEQRRYVQ--	SARSQVHSTCWALLGLMAVR--HPDIS	-----	-----	AQERCIRCLLKGKOLPN
[45]	WGED	FESCEQRRYVQ--	SAQSQIHNSTCWALLGLMAVR--HPDIE	-----	-----	AQERCIRCLLKGKOLPN
[37]	WGES	MKSSELHYSVD--	SEK--SLVVQTAWALLALIFAEYPNKE	-----	-----	VIDRGTDLKKNROES
[38]	WSES	MKGCEHYSYVN--	GEN--SLVVQSAWALLGLILGNYPDEE	-----	-----	PIKRCIQFLMKROLEPT
[39]	WSES	VMACVTGVYTE--	TES--SLVTQTGWALLDALINAKYPDRK	-----	-----	PIKRCIKFLMASOKSD
[40]	WSE	GYQSCDTGIWTR--	HPTGSQVNTAWACITGLMYPNPDET	-----	-----	PIKRCIKFLMASOKSD
[41]	WSES	YKACETGEYVE--	HPTGSQVNTAWALLGLIKKYPND	-----	-----	PIKRCIKLIMROQPN
[42]	WSES	YKSCETMQWHE--	HPDGSQVNTAWALLGLIMHGQCPDIA	-----	-----	AMKRCIKLIMROQPN
[35]	WGED	VACARGVWVD--	NPSGSQVNTAWAVMAIMASGEASSTELRRQLR	-----	-----	ILKAVSACIHFIVSRQLST
[36]	WGED	VASVRSWVD--	NPSGSQVNTAWAVMAIMASGEASSTELRRQLR	-----	-----	ISVAVERGIRLIMSROLVT
[33]	WGED	YHGCLRQEYVEH--	PESOATMTSAWALLALCETVGTGHPAV	-----	-----	QKCAAWLASROCRAD
[34]	WGE	HYSCLEGRYVES--	RHSQTAVNTAWALLALVYLPAAHFAV	-----	-----	ERCIAWLLCSQOGED
[29]	WNG	YEAVPYPFY	TALSLSLLFFENNIHSREVKDSVLWLIENQND	-----	-----	GSWFSKPIILRVDPQVREP
[27]	WG	-----	-----	-----	-----	LDKCSIHLMYSONLNL
[28]	WGG	--ESVRET	FGLPEGFISSVEETALAVEALVSWWGRIPNEGGQAAENDIPDGS	PWDASMRALRAAILSG	-----	TRW
[31]	VTST	TEGAHYEPASIWATAYAMRALBAYLNP	LFYKIKTK	-----	-----	PNENESVSKTERET
[30]	IDMS	RYNQDKVIYLLKLGKFTVNGISLDGRGNL	VIVPCRRN	-----	-----	ECALLFVLYYGKN

590 F601A 610 620 630

[01] --GGWDEPYITCTGFPGDFYLCYTMVYRHVFPPTALGRYKQATERR-----
[02] --GGWDEEVYITCTGFPGDFYLAITMYRDILPVWALGRYQEQAMQIRG-----
[03] --GSWDEPYFYTCTGFPWDFSIINYNLYRQVFPPLTALGRYVHGEPFAKKPRAADAPAEAAPAEVKGS--
[04] --GSWDEPYFYTCTGFPWDFSIINYNLYRQVFPPLTALGRYVNGEPLV-----EVKGG-----
[05] --GSWFAYFTCTGFPCHFYLKVHYYQQYFPLIALGRYQAIKSL-----
[06] --GTWFANFTCTGFPYFYLRVHLYQQYFPLIALGRYQAAIKES-----
[07] --CTWHEDYFTCTGFPCHFYLKVHYYQQHFPLTALGRYARWRNLLAT-----
[08] --GSWLEDEFTCTGFPGHFYLRVHLYQQHFPLSALGRYRRLLS-----
[09] --GSWDEPYFYTCTGFPGHFYLRVHLYQQHFPLSALGRYRRLLS-----
[10] --GTWEEAAYTCTGFPCHFYLKVHYYRQYFPLIALARYSHLQAS-----
[14] --CLWDEQRYTATGFPVVFYLRVHGYSKFFPLWGLARYRNLNRTNSRVVGVGM--
[15] --GLWDEQRHTATGFPVVFYLRVHGYSKFFPLWGLARYRNLNRTNSRVVGVGM--
[16] --CLWDEQRYTATGFPVVFYLRVHGYSKFFPLWGLARYRNLNRTNSRVVGVGM--
[17] --GLWNEERYTATGFPVVFYLRVHGYSKFFPLWGLARYRNLNRTNSRVVGVGM--
[18] --CLWDETRFTATGFPVVFYLRVHGYSKFFPLWGLARYRNLNRTNSRVVGVGM--
[19] --GFWDEPYFTAVGFPVVFYLRVHGYSKFFPLWGLARYRNLNRTNSRVVGVGM--
[20] --CLWKEDEYYSGGFPVVFYLRVHGYSKFFPLWGLARYRNLNRTNSRVVGVGM--
[21] --GKWEELYNVAVGFPVVFYLRVHGYSKFFPLWGLARYRNLNRTNSRVVGVGM--
[22] --CLWDEPWFTAPGFPVVFYLRVHGYSKFFPLWGLARYRNLNRTNSRVVGVGM--
[23] --GFWDECFPTAPGFPVVFYLRVHGYSKFFPLWGLARYRNLNRTNSRVVGVGM--
[24] --GLWDESHNAPGFPVVFYLRVHGYSKFFPLWGLARYRNLNRTNSRVVGVGM--
[25] --GTWEEKHFTCTGFPVVFYLRVHGYSKFFPLWGLARYRNLNRTNSRVVGVGM--
[26] --GTWEEKHFTCTGFPVVFYLRVHGYSKFFPLWGLARYRNLNRTNSRVVGVGM--
[32] VSAATWPEDDYTATGFPGHFYLRVHLYQQYFPLIALGRYKQATERR-----
[12] -----YPTCTGLPGAFYIRVHSHYAHYPLLLTLAHYIKKYRK-----
[13] -----YPTCTGLPGGFYIRVHSHYAHYPLLLTLAHYIKKYRK-----
[11] -----LAYPAGIQLPKQFYIRVHSHYAHYPLLLTLAHYIKKYRK-----
[58] --GDFPQEEITG-VFNKNCMISYSAYRNIFFPIWALGEYRCRVLKAL-----
[59] --GDFPQEEITG-IFNKNCMISYAAYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAP-----
[56] --GDFPQEEITG-VFDKNCMIYAAYRNIFFPIWALGEYRCRVLQGP-----
[57] --GDFPQEEITG-VFNKNCMIYAAYRNIFFPIWALGEYRCRVLQTP-----
[54] --GDFPQEEITG-VFNKNCMIYAAYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAP-----
[55] --GDFPQEEITG-VFNKNCMIYAAYRNIFFPIWALGEYRCRVLQGP-----
[53] --GDFPQEEITG-VFNKNCMIYAAYRNIFFPIWALGEYRCRVLQGP-----
[51] --GDFPQEEITG-VFNKNCMISYSQYRDIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[52] --GDFPQEEITG-VFNKNCMISYSYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[50] --GDFPQEEITG-VFNKNCMISYSYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[49] --GDFPQEEITG-VFNKNCMISYSAYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[48] --GDFPQEEITG-VFNKNCMISYSAYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[60] --GDFPQEEITG-AFMKNCTLNYSYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[61] --GDFPQEEITG-VFMKNCTLNYSYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[62] --GDFPQEEITG-VFMKNCTLNYSYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[63] --GDFPQEEITG-VFMKNCTLNYSYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[66] --GDFPQEEITG-VFMKNCTLNYSYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[67] --GDFPQEEITG-VFMKNCTLNYSYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[68] --GDFPQEEITG-VFMKNCTLNYSYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[69] --GDFPQEEITG-VFMKNCTLNYSYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[71] --GDFPQEEITG-VFMKNCTLNYSYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[72] --GDFPQEEITG-VFMKNCTLNYSYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[70] --GDFPQEEITG-VFMKNCTLNYSYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[73] --GDFPQEEITG-VFMKNCTLNYSYRNIFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[64] --GDFPQEEITG-AFMNTCMLHYATYRNTFFPIWALGEYRCRVLQAGK-----
[74] --GDFPQEEITG-EFFKNCTLHFAAFREVFVPMALGEYCNKVPLPSKPK-----
[65] --GDFPQEEITG-CFNSSLNFNWANYRNLPIYIMALGEYCNKVPLPSKPK-----
[47] --GDFPQEEITG-VFNKNCMISYSNYKNIFFPIWALSRVNLQYLKSKI-----
[46] --GRWPPEPIVIG-IFNRTCAIHYDAYLRIFFPIWALAVCDKR-----
[43] --GDWPQENISG-VFNKSCAISYTSYRNIFFPIWALGRFSNLYPDNTLAGHI-----
[44] --GEWQENISG-VFNKSCAISYTSYRNIFFPIWALGRFSNLYPDNTLAGHI-----
[45] --GDWPQENISG-VFNKSCAISYTSYRNIFFPIWALGRFSNLYPDNTLAGHI-----
[37] --GEWKFESEVIG-VFNHSCAIEVPSYRFLFPIKALGMYSRAYETHTL-----
[38] --GEWKYEDIEG-VFNHSCAIEVPSYRFLFPIKALGMYSRAYETHTL-----
[39] --GSWQKSMIEG-IFNKNVAIAMPNYKLYFSIYTLGKFAKQYGNLYTI-----
[40] --GEWKQEAIEG-VFNKNCMISVPSYRFLFPIKALGMYSRAYETHTL-----
[41] --GEWKQEAIEG-VFNKNCMISVPSYRFLFPIKALGMYSRAYETHTL-----
[42] --GEWKQEAIEG-VFNKNCMISVPSYRFLFPIKALGMYSRAYETHTL-----
[35] --GDWAQERISG-VFNKNCMISVPSYRFLFPIKALGMYSRAYETHTL-----
[36] --GDWAQERISG-VFNKNCMISVPSYRFLFPIKALGMYSRAYETHTL-----
[33] --GSYPREAVNG-VFFGTAMLDYDLYRAYFPTWALALAS-----
[34] --GWPRQGMNG-VFFGAAMLDRLYPVYFPTWALARVRL-----
[29] -----VWGSNREKCEVVDVNLFFTTATVMGALYDFLNLSGYSGSASHE-----
[27] -----GSFKPSYKAIYAKGWDYEEPIITALTALSRVYEQLFK-----
[28] LIDAVQRRHQVAWPIGFYFAKLWYERLYPLVYTTAALGRVMQRDELLR-----
[31] -----VSGGTETEENKRQEKSKRGVPLPAVEPVRQRQGGQYRHR-----
[30] -----VEEIAKRALQPSLLKYFHGKAVI IKWNDVNKDGEVEDELTVKFL-----

7. Literaturverzeichnis

- ABE, I., ROHMER, M., PRESTWICH, G.D. (1993): Enzymatic cyclization of squalene and oxidosqualene to sterols and triterpenes. *Chem. Rev.* **93**: 2189-2206
- ABE, I., PRESTWICH, G.D. (1994): Active site mapping of affinity-labeled rat oxidosqualene cyclase. *J. Biol. Chem.* **269**: 802-804
- ABE, I., ROHMER, M. (1994): Enzymic cyclization of 2,3-dihydrosqualene and squalene 2,3-epoxide by squalene cyclases: From pentacyclic to tetracyclic triterpenes. *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **1**: 783-791
- ABE, I., PRESTWICH, G.D. (1995): Molecular cloning, characterization, and functional expression of rat oxidosqualene cyclase cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 9274-9278
- ABE, I., DANG, T., ZHENG, Y.F., MADDEN, B.A., FEIL, C., PORALLA, K., PRESTWICH, G.D. (1997): Cyclization of (3*S*)-29-methylidene-2,3-oxidosqualene by bacterial squalene-hopene cyclase: irreversible enzyme inactivation and isolation of an unnatural dammarenoide. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 11333-11334
- ABE, I., PRESTWICH, G.D. (1999): Squalene epoxidase and oxidosqualene: lanosterol cyclase – Key enzymes in cholesterol biosynthesis. In: BARTON, D., NAKANISHI, K. (Hrsg.) *Comprehensive natural product chemistry*. Vol. 2: Isoprenoids including carotenoids and steroids. 267-297. Elsevier, Amsterdam
- ABE, I., NAITO, K., TAKAGI, Y., NOGUCHI, H. (2001): Molecular cloning, expression, and site-directed mutations of oxidosqualene cyclase from *Cephalosporium caerulens*. *Biochim. Biophys. Acta* **1522**: 67-73
- ALLINGER, N.L. (1977): Conformational Analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V_1 and V_2 torsional terms. *J. Amer. Chem. Soc.* **99**: 8127-8134
- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A., ZHANG, J., ZHANG, Z., MILLER, W., LIPMANN, D.J. (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database research programs. *Nucl. Acid Res.* **25**: 3389-3402
- ARMSTRONG, G.A., HEAST, J.E. (1996): Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *FASEB J.* **10**: 228-237
- BACH, T.J. (1995): Some new aspects of isoprenoid biosynthesis in plants – a review. *Lipids* **30**: 191-202
- BACK, K., CHAPPELL, J. (1996): Identifying functional domains within terpene cyclases using a domain-swapping strategy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 6841-6845
- BAKER, C.H., MATSUDA, S.P.T., LIU, D.R., COREY, E.J. (1995): Molecular cloning of the human gene encoding lanosterol synthase from a liver cDNA library. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **213**: 154-160
- BENTLEY, S.D., CHATER, K.F., CERDENO-TARRAGA, A.M., CHALLIS, G.L., THOMSON, N.R., JAMES, K.D., HARRIS, D.E., QUAIL, M.A., KIESER, H., HARPER, D., BATEMAN, A., BROWN, S., CHANDRA, G., CHEN, C.W., COLLINS, M., CRONIN, A., FRASER, A., GOBLE, A., HIDALGO, J., HORNSBY, T., HOWARTH, S., HUANG, C.H., KIESER, T., LARKE, L., MURPHY, L., OLIVER, K., O'NEIL, S., RABBINOWITSCH, E., RAJANDREAM, M.A., RUTHERFORD, K., RUTTER, S., SEEGER, K., SAUNDERS, D., SHARP, S., SQUARES, R., SQUARES, S., TAYLOR, K., WARREN, T., WIETZORREK, A., WOODWARD, J.,

- BARRELL, B.G., PARKHILL, J., HOPWOOD, D.A. (2002): Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature* **417**: 141-147
- BIRD, C.W., LYNCH, J.M., PIRT, F.J., REID, W.W., BROOKS, C.J.W., MIDDLEDITCH, B.S. (1971): Steroids and squalene in *Methylococcus capsulatus* grown in methane. *Nature* **230**: 473-474
- BLOCH, K. (1992): Sterol molecule: structure, biosynthesis and function. *Steroids* **57**: 378-383
- BLUM, H., BEIER, H., GROSS, H. (1987): Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**: 93-99
- BODE, H.B., ZEGGEL, B., SILAKOWSKI, B., WENZEL, S.C., REICHENBACH, H., MÜLLER, R. (2003): Steroid biosynthesis in prokaryotes: identification of myxobacterial steroids and cloning of the first bacterial 2,3(S)-oxidosqualene cyclase from the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. *Mol. Microbiol.* **47**: 471-481
- BOHLMANN, J., STEELE, C.L., CROTEAU, R. (1997): Monoterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). *J. Biol. Chem.* **272**: 21784-21792
- BOHLMANN, J., MEYER-GAUEN, G., CROTEAU, R. (1998): Plant terpenoid synthases: molecular biology and phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 4126-4133
- BOUCHER, Y., DOOLITTLE, W.F. (2000): The role of lateral gene transfer in the evolution of isoprenoid biosynthesis pathways. *Mol. Microbiol.* **37**: 703-716
- BOUCHER, Y., HUBER, H., L'HARIDON, S., STETTER, K.O., DOOLITTLE, W.F. (2001): Bacterial origin for the isoprenoid biosynthesis enzyme HMG-CoA reductase of the archaeal orders *Thermoplasmatales* and *Archaeoglobales*. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 1378-1388
- BOUVIER, P., ROHMER, M., BENVENISTE, P., OURISSON, G. (1976): $\Delta^8(14)$ -steroids in the bacterium *Methylococcus capsulatus*. *Biochem. J.* **159**: 267-271
- BRASIER, M.D., GREEN, O.R., JEPHCOAT, A.P., KLEPPE, A.K., VAN KRANENDONK, M.J., LINDSAY, J.F., STEELE, A., GRASSINEAU, N.V. (2002): Questioning the evidence for earth's oldest fossils. *Nature* **416**: 76-81
- BROCK, T.D. (1978): Thermophilic microorganisms and life at high temperatures. Springer series in microbiology. Springer Verlag, New York
- BROCKS, J.J., LOGAN, G.A., BUICK, R., SUMMONS, R.E. (1999): Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. *Science* **285**: 1033-1036
- BROSIUS, J., HOLY, A. (1984): Regulation of ribosomal RNA promoters with a synthetic lac operator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**: 6929-6933
- BUCKNER, F.S., NGUYEN, L.N., JOUBERT, B.M., MATSUDA, S.P. (2000): Cloning and heterologous expression of the *Trypanosma brucei* lanosterol synthase gene. *Mol. Biochem. Parasitol.* **110**: 399-403
- BUNTEL, C.J., GRIFFIN, J.H. (1992): Nucleotide and deduced amino acid sequences of the oxidosqualene cyclase from *Candida albicans*. *J. Am. Chem. Soc.* **114**: 9711-9713
- CANE, D.E. (1999): Isoprenoid biosynthesis: overview. In: BARTON, D., NAKANSHI, K. (Hrsg.) Comprehensive natural product chemistry. Vol. 2: Isoprenoids including carotenoids and steroids. 1-13. Elsevier, Amsterdam
- CAPASSO, C., NAZZARO, F., MARULLI, F., CAPASSO, A., LA-CARA, F., PARISI, E. (1996): Identification of a high-molecular-weight cadmium-binding protein in copper-resistant *Bacillus acidocaldarius* cells. *Res. Microbiol.* **147**: 287-296

- CASTENHOLZ, R.W. (2001): Phylum BX. Cyanobacteria: Oxygenic photosynthetic Bacteria. In: GARRITY, G.M. (Hrsg.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1: The *Archaea* and the deeply branching and phototrophic *Bacteria*. 473-487. Springer, New York
- CHALMERS, A. (1814): The general biographical dictionary, containing an historical and critical account of the lives and writing of the most eminent persons in every nation: particularly the British and Irish; from the earliest accounts to the present time. Nichols, London
- CHAIN, P., LAMERDIN, J., LARIMER, F., REGALA, W., LAND, M., HAUSER, L., HOOPER, A., KLOTZ, M., NORTON, J., SAYAVEDRA-SOTO, L., ARCIERO, D., HOMMES, N., WHITTAKER, M., ARP, D. (2003): Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J. Bacteriol.* **185**: 2759-2773
- CHAPPEL, J. (1995): Biochemistry and molecular biology of the isoprenoid biosynthetic pathway in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **46**: 521-547
- CHOI, O.-B. (1995): Experimente zur Klonierung, Sequenzierung und Expression der Squalen-Hopen-Cyclase aus *Rhodospseudomonas palustris* und *Alicyclobacillus acidoterrestris*. Dissertation. Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- CHUNG, C.T., NIEMALA, S.L., MILLER, R.H. (1989): One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**: 2172-2175
- COHEN, G., BARBE, V., FLAMENT, D., GALPERIN, M., HEILIG, R., RIPP, R., LECOMPTE, O., PRIEUR, D., POCH, O., QUELLEROU, J., THIERRY, J.C., VAN DER OOST, J., WEISSENBACH, J., ZIVANOVIC, Y., FORTERRE, P. (2003): An integrated analysis of the genome of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol. Microbiol.* **47**: 1495-1512
- CONOLLY, J.D., HILL, R.A. (1991): Dictionary of terpenoids. Chapman & Hall. London
- COREY, E.J., MATSUDA, S.P.T., BARTEL, B. (1993): Isolation of an *Arabidopsis thaliana* gene encoding cycloartenol synthase by functional expression in a yeast mutant lacking lanosterol synthase by the use of a chromatographic screen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 11628-11632
- COREY, E.J., MATSUDA, S.P.T., BARTEL, B. (1994): Molecular cloning, characterization, and overexpression of *ERG7*, the *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding lanosterol synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 2211-2215
- COREY, E.J., VIRGIL, S.C., CHENG, H., BAKER, C.H., MATSUDA, S.P.T., SINGH, V., SARSHAR, S. (1995): New insights regarding the cyclization pathway for sterol biosynthesis from (S)-2,3-oxidosqualene. *J. Am. Chem. Soc.* **117**: 11819-11820
- COREY, E.J., MATSUDA, S.P.T., BAKER, C.H., TING, A.Y., CHENG, H. (1996): Molecular cloning of a *Schizosaccharomyces pombe* cDNA encoding lanosterol synthase and investigation of conserved tryptophane residue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **219**: 327-331
- COREY, E.J., CHENG, H. (1996): Conversion of a C₂₀ 2,3-oxidosqualene analog to tricyclic structures with a five-membered C-ring by lanosterol synthase. Further evidence for a C-ring expansion step in sterol biosynthesis. *Tetrahedron Lett.* **37**: 2709-2712
- COREY, E.J., CHENG, H., BAKER, C.H., MATSUDA, S.P.T., LI, D., SONG, X. (1997a): Methodology for a preparation of pure recombinant *S. cerevisiae* lanosterol synthase using a

- baculovirus expression system. Evidence that oxirane cleavage and A-ring formation are concerted in the biosynthesis of lanosterol from 2,3-oxidosqualene. *J. Am. Chem. Soc.* **119**: 1277-1288
- COREY, E.J., CHENG, H., BAKER, C.H., MATSUDA, S.P.T., LI, D., SONG, X. (1997b): Studies on the substrate binding segments and catalytic action of lanosterol synthase. Affinity labeling with carbocations derived from mechanism-based analogs of 2,3-oxidosqualene and site-directed mutagenesis probes. *J. Am. Chem. Soc.* **119**: 1289-1296
- DARLAND, G., BROCK, T.D. (1971): *Bacillus acidocaldarius* sp. nov., an acidophilic thermophilic spore-forming bacterium. *J. Gen. Microbiol.* **67**: 9-15
- DARR, L.B., GODZINA, S.M., MATSUDA, S.P.T. (1999): A rice cDNA (AF169966) similar to cycloartenol synthase. (PGR99-155). *Plant Physiol.* **121**: 686
- DEINHARD, G. (1987): *Bacillus acidoterrestris* sp. nov. und *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov., zwei neue acidophile *Bacillus*-Arten, die omega-allycycloheptane Fettsäuren enthalten. Dissertation. Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- DEINHARD, G., BLANZ, P., PORALLA, K., ALTAN, E. (1987a): *Bacillus acidoterrestris* sp. nov., a new thermotolerant acidophile isolated from different soils. *Appl. Microbiol.* **10**: 47-53
- DEINHARD, G., SAAR, J., KRISCHKE, W., PORALLA, K. (1987b): *Bacillus cycloheptanicus* sp. nov., a new thermoacidophile containing ω -cycloheptane fatty acids. *Appl. Microbiol.* **10**: 68-73
- DEINHARD, G., PORALLA, K. (1996): Vorkommen, Biosynthese und Funktion ω -allycycloheptane Fettsäuren bei Bakterien. *Biospektrum* **2**: 40-46
- DENG, W.P., NICKOLOFF, J.A. (1992): Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* **200**: 81-88
- DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., MINALE, L. (1971a): Bacterial Triterpenes. *Chem. Comm.* **1971**: 619-620
- DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., MINALE, L., BU'LOCK, J.D. (1971b): Cyclohexane fatty acids from a thermophilic bacterium. *Chem. Comm.* **1971**: 1334
- DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., MINALE, L., BU'LOCK, J.D. (1972): The formation of ω -cyclohexyl-fatty acids from shikimate in an acidophilic thermophilic bacillus. A new biosynthetic pathway. *Biochem. J.* **128**: 751-754
- DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., MINALE, L., BU'LOCK, J.D. (1973): Isoprenoids of *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Phytochemistry* **12**: 1117-1123
- DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., BU'LOCK, J.D. (1974): Specificity effects in the biosynthesis of fatty acids in *Bacillus acidocaldarius*. *Phytochemistry* **13**: 905-910
- DOUGHERTY, D.A. (1996): Cation- π interactions in chemistry and biology: a new view of benzene, Phe, Tyr, and Trp. *Science* **271**: 163-168
- DOUKA, E., KOUKKOU, A.-I., DRAINAS, C., GROSDÉMANGE-BILLIARD, C., ROHMER, M. (2001): Structural diversity of the triterpenic hydrocarbons from the bacterium *Zymomonas mobilis*: the signature of defective squalene cyclization by the squalene/hopene cyclase. *FEMS Microbiol. Lett.* **199**: 247-251
- FEIL, C., SÜSSMUTH, R., JUNG, G., PORALLA, K. (1996): Site-directed mutagenesis of putative active-site residues in squalene-hopene cyclase. *Eur. J. Biochem.* **242**: 51-55

- FEIL, E.C. (1997): Ortsspezifische Mutagenese zur Identifizierung katalytisch aktiver Aminosäuren der Squalen-Hopen-Cyclase von *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Dissertation. Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- FLESCH, G., ROHMER, M. (1988): Prokaryotic hopanoids: the biosynthesis of the bacteriohopane skeleton. *Eur. J. Biochem.* **175**: 405-411
- FÖRSTER, H.J., BIERMANN, K., HAIGH, W., TATTRIE, N.H., COLVIN, J.R. (1973): The structure of novel C₃₅ pentacyclic triterpenes from *Acetobacter xylinum*. *Biochem. J.* **135**: 133-145
- FREIBERG, C., FELLAY, R., BAIROCH, A., BROUGHTON, W.J., ROSENTHAL, A., PERRET, X. (1997): Molecular basis of symbiosis between Rhizobium and legumes. *Nature* **387**: 352-401
- FÜLL, C., PORALLA, K. (2000): Conserved Tyr residues determine functions of *Alicyclobacillus acidocaldarius* squalene-hopene cyclase. *FEMS Microbiol. Lett.* **183**: 221-224
- FÜLL, C. (2001a): Veränderung der Produktspezifität der Squalen-Hopen-Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* durch Mutagenese. Dissertation. Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- FÜLL, C. (2001b): Bicyclic triterpenes as new main products of squalene-hopene cyclase by mutation of conserved tyrosine residues. *FEBS Lett.* **509**: 361-364
- GALAGAN, J.E., NUSBAUM, C., ROY, A., ENDRIZZI, M.G., MACDONALD, P., FITZHUGH, W., CALVO, S., ENGELS, R., SMIRNOV, S., ATNOOR, D., BROWN, A., ALLEN, N., NAYLOR, J., STANGE-THOMANN, N., DEARELLANO, K., JOHNSON, R., LINTON, L., MCEWAN, P., MCKERNAN, K., TALAMAS, J., TIRRELL, A., YE, W., ZIMMER, A., BARBER, R.D., CANN, I., GRAHAM, D.E., GRAHAME, D.A., GUSS, A., HEDDERICH, R., INGRAM-SMITH, C., KUETTNER, C.H., KRZYCKI, J.A., LEIGH, J.A., LI, W., LIU, J., MUKHOPADHYAY, B., REEVE, J.N., SMITH, K., SPRINGER, T.A., UMayAM, L.A., WHITE, O., WHITE, R.H., DE MACARIO, E.C., FERRY, J.G., JARRELL, K.F., JING, H., MACARIO, A.J.L., PAULSEN, I., PRITCHETT, M., SOWERS, K.R., SWANSON, R.V., ZINDER, S.H., LANDER, E., METCALF, W.W., BIRREN, B. (2002): The genome of *M. acetivorans* reveals extensive metabolic and physiological diversity. *Genome Res.* **12**: 532-542
- GALAGAN, J.E., CALVO, S.E., BORKOVICH, K.A., SELKER, E.U., READ, N.D., JAFFE, D., FITZHUGH, W., MA, L.-J., SMIRNOV, S., PURCELL, S., REHMAN, B., ELKINS, T., ENGELS, R., WANG, S., NIELSEN, C.B., BUTLER, J., ENDRIZZI, M., QUI, D., IANAKIEV, P., PEDERSEN, D., NELSON, M., WASHBURNE, M., SELITRENNIKOFF, C.P., KINSEY, J.A., BRAUN, E.L., ZELTER, A., SCHULTE, U., KOTHE, G.O., JEDD, G., MEWES, W., STABEN, C., MARCOTTE, E., GREENBERG, D., ROY, A., FOLEY, K., NAYLOR, J., THOMANN, N., BARRETT, R., GNERRE, S., KAMAL, M., KAMVYSSELIS, M., MAUCELI, E., BIELKE, C., RUDD, S., FRISHMAN, D., KRYSOFOVA, S., RASMUSSEN, C., METZENBERG, R.L., PERKINS, D.D., KROKEN, S., COGONI, C., MACINO, G., CATCHESIDE, D., LI, W., PRATT, R.J., OSMANI, S.A., DESOUSA, C.C., GLASS, L., ORBACH, M.J., BERGLUND, J., VOELKER, R., YARDEN, O., PLAMANN, M., SEILER, S., DUNLAP, J., RADFORD, A., ARAMAYO, R., NATVIG, D.O., ALEX, L.A., MANNHAUPT, G., EBBOLE, D.J., FREITAG, M., PAULSEN, I., SACHS, M.S., LANDER, E.S., NUSBAUM, C., BIRREN, B. (2003): The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *Nature* **422**: 859-868
- GAMAS, P., NIEBEL, F.C., LESCURE, N., CULLIMORE, J. (1996): Use of a subtractive hybridization approach to identify new *Medicago truncatula* genes induced during root nodule development. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**: 233-242

- GARRITY G.M., HOLT, J.G. (2001): The road map to the *Manual*. In: GARRITY, G.M. (Hrsg.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 1: The *Archaea* and the deeply branching and phototrophic *Bacteria*. 119-166. Springer, New York
- GIBBS, R.A. (1998): Prenyl transfer and the enzymes of terpenoid and steroid biosynthesis. In: SINNOTT, M. (Hrsg.): *Comprehensive biological catalysis: A Mechanistic Reference*. Vol. 1: Reaction of Electrophilic Carbon, Phosphorous and Sulfur. 31-118. Academic Press, London.
- GLÖCKNER, F.O., KUBE, M., BAUER, M., TEELING, H., LOMBARDOT, T., LUDWIG, W., GADE, D., BECK, A., BORZYM, K., HEITMANN, K., RABUS, R., SCHLESNER, H., AMANN, R., REINHARDT, R. (2003): Complete genome sequence of the marine planctomycete *Pirellula* sp. strain 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 8298-8303
- GOERKE, H. (1992): Carl von Linné: 1707 – 1778. Arzt – Naturforscher – Systematiker. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- GODZINA, S.M., LOVATO, M.A., MEYER, M.M., FOSTER, K.A., WILSON, W.K., GU, W., DE HOSTOS, E.L., MATSUDA, S.P.T. (2000): Cloning and characterization of the *Dictyostelium discoideum* cycloartenol synthase cDNA. *Lipids* **35**: 249-255
- GUEx, N., PEITSCH, M.C. (1996): Swiss-PdbViewer: a fast and easy-to-use PDB Viewer for Macintosh and PC. *Protein Data Bank Quarterly Newsletter* **77**: 7
- GUEx, N., PEITSCH, M.C. (1997a): Protein modelling via the internet. *Bio World* **5/97**: 9-13
- GUEx, N., PEITSCH, M.C. (1997b): SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. *Electrophoresis* **18**: 2714-2723.
- GUEx N., DIEMAND, A., PEITSCH, M.C. (1999): Protein modelling for all. *TIBS* **24**: 364-367
- HANAHAH, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- HARALAMPIDIS, K., BRYAN, G., QI, X., PAPADOPOULOU, K., BAKHT, S., MELTON, R., OSBOURN, A. (2001): A new class of oxidosqualene cyclases directs synthesis of antimicrobial phytoproducts in monocots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 13431-13436
- HART, E.A., HUA, L., DARR, L.B., WILSON, W.K., PANG, J., MATSUDA, S.P.T. (1999): Directed evolution to investigate steric control of enzymatic oxidosqualene cyclization: an isoleucine to valine mutation in cycloartenol synthase allows lanosterol and parkeol biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **121**: 9887-9888
- HAYASHI, H., HIRAOKA, N., IKESHIRO, Y., YAZAKI, K., TANAKA, S., KUSHIRO, T., SHIBUYA, M., EBIZUKA, Y. (1999): Molecular cloning of a cDNA encoding cycloartenol synthase from *Luffa cylindrica*. *Plant Physiol.* **121**: 1383-1385
- HAYASHI, H., HIRAOKA, N., IKESHIRO, Y., KUSHIRO, T., MORITA, M., SHIBUYA, M., EBIZUKA, Y. (2000): Molecular cloning and characterization of a cDNA for *Glycyrrhiza glabra* cycloartenol synthase. *Biol. Pharm. Bull.* **23**: 231-234
- HAYASHI, H., HUANG, P., KIRAKOSYAN, A., INOUE, K., HIRAOKA, N., IKESHIRO, Y., KUSHIRO, T., SHIBUYA, M., EBIZUKA, Y. (2001a): Cloning and characterization of a cDNA encoding beta-amyrin synthase involved in glycyrrhizin and soyasaponin biosyntheses in licorice. *Biol. Pharm. Bull.* **24**: 912-916
- HAYASHI, H., HUANG, P., INOUE, K., HIRAKA, N., IKESHIRO, Y., YAZAKI, K., TANAKA, S., KUSHIRO, T., SHIBUYA, M., EBIZUKA, Y. (2001b): Cloning and characterization of isomultiflorenol synthase, a new triterpene synthase from *Luffa cylindrica*, involved in biosynthesis of bryonolic acid. *Eur. J. Biochem.* **268**: 6311-6317

- HELLER, H., SCHAEFER, M., SCHULTEN, K. (1993): Molecular dynamics simulation of a bilayer of 200 lipids in the gel and in the liquid-crystal phases. *J. Phys. Chem.* **97**: 8343-8360
- HERRERA, J.B., BARTEL, B., WILSON, W.K., MATSUDA, S.P.T. (1998): Cloning and characterization of the *Arabidopsis thaliana* lupeol synthase gene. *Phytochemistry* **49**: 1905-1911
- HERRERA, J.B., WILSON, W.K., MATSUDA, S.P.T. (2000): A tyrosine-to-threonine mutation converts cycloartenol synthase to an oxidosqualene cyclase that forms lanosterol as its major product. *J. Am. Chem. Soc.* **122**: 6765-6766
- HERRMANN, A., SCHLOSSER, A., SCHMID, R., SCHNEIDER, E. (1996): Biochemical identification of a lipoprotein with maltose-binding activity in the thermoacidophilic Gram-positive bacterium *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Res. Microbiol.* **147**: 733-737
- HESS, B.A., JR. (2003): Formation of the C ring in the lanosterol biosynthesis from squalene. *Org. Lett.* **5**: 165-167
- HESS, B.A., JR. (2004): Formation of the B ring in steroids and hopanoids from squalene. *Eur. J. Org. Chem.* **2004**: 2239-2242
- HESS, B.A., JR., SMENTEK, L. (2004): Concerted nature of AB ring formation in the enzymatic cyclization of squalene to hopenes. *Org. Lett.* **6**: 1717-1720
- HILDEBRANDT, F. (1927): Beiträge zur Frage der Selbsterwärmung des Heues. *Zentralbl. Bakteriol. 2 Abt.* **71**: 440-490
- HOLLER, S., PFENNIG, N., NEUNLIST, S., ROHMER, M. (1993): Effect of a non-methanogenic symbiont and exogenous stigmasterol on the viability and tetrahymanol content of the anaerobic ciliate *Trimyema compressum*. *Eur. J. Protistol.* **29**: 42-49
- HOLMES, D.S., QUIGLEY, M. (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**: 193-197
- HORBACH, S., NEUSS, B., SAHM, H. (1991): Effect of azasqualene on hopanoid biosynthesis and ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **79**: 347-350
- HORBACH, S., WELLE, R., SAHM, H. (1993): Isoprenoid biosynthesis in bacteria: two different pathways? *FEMS Microbiol. Lett.* **115**: 135-140
- HOSHINO, T., SATO, T. (1999): Functional analysis of phenylalanine 365 in hopene synthase, a conserved amino acid in the families of squalene and oxidosqualene cyclases. *Chem. Comm.* **1999**: 2005-2006
- HOSHINO, T., KOUDA, M., ABE, T., OHASHI, S. (1999): New cyclization mechanism for squalene: a ring-expansion step for the five-membered C-ring intermediate in hopene biosynthesis. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 2038-2041
- HOSHINO, T., ABE, T., KOUDA, M. (2000a): Unnatural natural triterpenes produced by altering isoleucine into alanine at position 261 in hopene synthase and the importance of having the appropriate bulk size at this position for directing the stereochemical destiny during the polycyclization cascade. *Chem. Comm.* **2000**: 441-442
- HOSHINO, T., ABE, T., KOUDA, M., SATO, T. (2000b): Functional analysis of Phe605, a conserved aromatic amino acid in squalene-hopene cyclases. *Chem. Comm.* **2000**: 1485-1486
- HOSHINO, T., SATO, T. (2002): Squalene-hopene cyclase: catalytic mechanism and substrate recognition. *Chem. Comm.* **2002**: 291-301

- HOSHINO, T., NAKANO, S., KONDO, T., SATO, T., MIYOSHI, A. (2004a): Squalene-hopene cyclase: final deprotonation reaction, conformational analysis for the cyclization of (3*R,S*)-2,3-oxidosqualene and further evidence for the requirement of an isopropylidene moiety both for initiation of the polycyclization cascade and for the formation of the 5-membered E-ring. *Org. Biomol. Chem.* **2**: 1456-1470
- HOSHINO, T., KUMAI, Y., KUDO, I., NAKANO, S., OHASHI, S. (2004b): Enzymatic cyclization reactions of geraniol, farnesol and geranylgeraniol, and those of truncated squalene analogs having C₂₀ and C₂₅ by recombinant squalene cyclase. *Org. Biomol. Chem.* **2**: 2650-2657
- HUBER, R. (1993): Hyperthermophile Lebensgemeinschaften in Vulkangebieten. In: HAUSMANN, K., KREMER, B.P. (Hrsg.) Extremophile: Mikroorganismen in ausgefallenen Lebensräumen. 49-67. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- IKEDA, H., ISHIKAWA, J., HANAMOTO, A., SHINOSE, M., KIKUCHI, H., SHIBA, T., SAKAKI, Y., HATTORI, M., OMURA, S. (2003): Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*. *Nat. Biotechnol.* **21**: 526-531
- ITURBE-ORMAETXE, I., HARALAMPIDIS, K., PAPADOPOULOU, K., OSBOURNE, A.E. (2003): Molecular cloning and characterization of triterpene synthases from *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Mol. Biol.* **51**: 731-743
- IVANOVA, N., SOROKIN, A., ANDERSON, I., GALLERON, N., CANDELON, B., KAPATRAL, V., BHATTACHARYYA, A., REZNIK, G., MIKHAILOVA, N., LAPIDUS, A., CHU, L., MAZUR, M., GOLTSMAN, E., LARSEN, N., D'SOUZA, M., WALUNAS, T., GRECHKIN, Y., PUSCH, G., HASELKORN, R., FONSTEIN, M., EHRLICH, D.S.D., OVERBEEK, R., KYRPIDES, N. (2003): Genome sequence of *Bacillus cereus* and comparative analysis with *Bacillus anthracis*. *Nature* **423**: 87-91
- JANNASCH, H.W. (1993): Die Mikroben der heißen Tiefseequellen. In: HAUSMANN, K., KREMER, B.P. (Hrsg.) Extremophile: Mikroorganismen in ausgefallenen Lebensräumen. 69-86. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- JOHNSON, W.S., TELFER, S.J., CHENG, S., SCHUBERT, U. (1987): Cation-stabilizing auxiliaries: a new concept in biomimetic polyene cyclization. *J. Am. Chem. Soc.* **109**: 2517-2518
- JOUBERT, B.M., BUCKNER, F.S., MATSUDA, S.P.T. (2001): Trypanosome and animal lanosterol synthases use different catalytic motifs. *Org. Lett.* **3**: 1957-1960
- KANEKO T, SATO S, KOTANI H, TANAKA A, ASAMIZU E, NAKAMURA Y, MIYAJIMA N, HIROSAWA M, SUGIURA M, SASAMOTO S, KIMURA T, HOSOUCHI T, MATSUNO A, MURAKI A, NAKAZAKI N, NARUO K, OKUMURA S, SHIMPO S, TAKEUCHI C, WADA T, WATANABE A, YAMADA M, YASUDA M, TABATA S. (1996): Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res.* **3**: 109-136
- KANEKO, T., NAKAMURA, Y., WOLK, C.P., KURITZ, T., SASAMOTO, S., WATANABE, A., IRIGUCHI, M., ISHIKAWA, A., KAWASHIMA, K., KIMURA, T., KISHIDA, Y., KOHARA, M., MATSUMOTO, M., MATSUNO, A., MURAKI, A., NAKAZAKI, N., SHIMPO, S., SUGIMOTO, M., TAKAZAWA, M., YAMADA, M., YASUDA, M., TABATA S. (2001): Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res.* **8**: 205-213, 227-253.

- KANNENBERG, E., PORALLA, K., BLUME, A. (1980): A hopanoid from the thermoacidophilic *Bacillus acidocaldarius* condenses membranes. *Naturwissenschaften* **67**: 458-459
- KANNENBERG, E., PORALLA, K. (1982): The influence of hopanoids on growth of *Mycoplasma mycoides*. *Arch. Microbiol.* **133**: 100-102
- KANNENBERG, E., PORALLA, K. (1999): Hopanoid biosynthesis and function in bacteria. *Naturwissenschaften* **86**: 168-176
- KAWANO, N., ICHINOSE, K., EBIZUKA, Y. (2002): Molecular cloning and functional expression of cDNAs encoding oxidosqualene cyclases from *Costus speciosus*. *Biol. Pharm. Bull.* **25**: 477-482
- KEMP, P., LANDER, D.G., ORPIN, C.G. (1984): The lipids of the rumen fungus *Pyromonas communis*. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 27-37
- KEON, J.P., JAMES, C.S., COURT, S., BADEN-DAINTREE, C., BAILEY, A.M., BURDEN, R.S., BARD, M., HARGREAVES, J.A. (1994): Isolation of the ERG2 gene, encoding sterol delta 8-delta 7 isomerase from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* and its expression in the maize smut pathogen *Ustilago maydis*. *Curr. Genet.* **25**: 531-537
- KLEEMANN, G., PORALLA, K., ENGLERT, G., KJØSEN, H., LIAAEN-JENSEN, S., NEUNLIST, S., ROHMER, M. (1990): Tetrahymanol from the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum*: first report of a gammacerane triterpene from a prokaryote. *J. Gen. Microbiol.* **136**: 2551-2553
- KNOLL, A.H. (2003): Life on a young planet: The first three billion years of evolution on earth. Princeton University Press, Princeton
- KUNST, F., OGASAWARA, N., MOSZER, I., ALBERTINI, A.M., ALLONI, G., AZEVEDO, V., BERTERO, M.G., BESSIERES, P., BOLOTIN, A., BORCHERT, S., BORRIS, R., BOURSIER, L., BRANS, A., BRAUN, M., BRIGNELL, S.C., BRON, S., BROUILLET, S., BRUSCHI, C.V., CALDWELL, B., CAPUANO, V., CARTER, N.M., CHOI, S.K., CODANI, J.J., CONNERTON, I.F., CUMMINGS, N.J., DANIEL, R.A., DENIZOT, F., DEVINE, K.M., DUSTERHOFT, A., EHRLICH, S.D., EMMERSON, P.T., ENTIAN, K.D., ERRINGTON, J., FABRET, C., FERRARI, E., FOULGER, D., FRITZ, C., FUJITA, M., FUJITA, Y., FUMA, S., GALIZZI, A., GALLERON, N., GHIM, S.Y., GLASER, P., GOFFEAU, A., GOLIGHTLY, E.J., GRANDI, G., GUISEPPI, G., GUY, B.J., HAGA, K., HAIECH, J., HARWOOD, C.R., HENAUT, A., HILBERT, H., HOLSAPPEL, S., HOSONO, S., HULLO, M.F., ITAYA, M., JONES, L., JORIS, B., KARAMATA, D., KASAHARA, Y., KLAERR-BLANCHARD, M., KLEIN, C., KOBAYASHI, Y., KOETTER, P., KONINGSTEIN, G., KROGH, S., KUMANO, M., KURITA, K., LAPIDUS, A., LARDINOIS, S., LAUBER, J., LAZAREVIC, V., LEE, S.M., LEVINE, A., LIU, H., MASUDA, S., MAUEL, C., MEDIGUE, C., MEDINA, N., MELLADO, R.P., MIZUNO, M., MOESTL, D., NAKAI, S., NOBACK, M., NOONE, D., O'REILLY, M., OGAWA, K., OGIWARA, A., OUDEGA, B., PARK, S.H., PARRO, V., POHL, T.M., ORTETELLE, D., PORWOLLIK, S., PRESCOTT, A.M., PRESECAN, E., PUJIC, P., PURNELLE, B., RAPOPORT, G., REY, M., REYNOLDS, S., RIEGER, M., RIVOLTA, C., ROCHA, E., ROCHE, B., ROSE, M., SADAIE, Y., SATO, T., SCANLAN, E., SCHLEICH, S., SCHROETER, R., SCOFFONE, F., SEKIGUCHI, J., SEKOWSKA, A., SEROR, S.J., SERROR, P., SHIN, B.S., SOLDI, B., SOROKIN, A., TACCONI, E., TAKAGI, T., TAKAHASHI, H., TAKEMARU, K., TAKEUCHI, M., TAMAKOSHI, A., TANAKA, T., TERPSTRA, P., TOGNONI, A., TOSATO, V., UCHIYAMA, S., VANDENBOL, M., VANNIER, F., VASSAROTTI, A., VIARI, A., WAMBUTT, R., WEDLER, E., WEDLER, H., WEITZENEGGER, T., WINTERS, P., WIPAT, A., YAMAMOTO, H., YAMANE, K., YASUMOTO, K., YATA, K., YOSHIDA, K., YOSHIKAWA, H.F., ZUMSTEIN, E., YOSHIKAWA, H., DANCHIN, A. (1997): The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**: 249-256

- KUSANO, M., SHIBUYA, M., SANKAWA, U., EBIZUKA, Y. (1995): Molecular cloning of cDNA encoding rat 2,3-oxidosqualene: lanosterol cyclase. *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 195-197
- KUSHIRO, T., SHIBUYA, M., EBIZUKA, Y. (1998): Beta-Amyrin synthase: cloning of oxidosqualene cyclase that catalyzes the formation of the most popular triterpene among higher plants. *Eur. J. Biochem.* **256**: 238-244
- KUSHIRO, T., SHIBUYA, M., EBIZUKA, Y. (1999a): Chimeric triterpene synthase. A possible model for multifunctional triterpene synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **121**: 1208-1216
- KUSHIRO, T., SHIBUYA, M., EBIZUKA, Y. (1999b): Cryptic regioselectivity in deprotonation step of triterpene biosynthesis catalyzed by new members of lupeol synthase. *Tetrahedron Lett.* **40**: 5553-5556
- KUSHIRO, T., SHIBUYA, M., MASUDA, K., EBIZUKA, Y. (2000): Mutational studies on triterpene synthases: engineering lupeol synthase into β -Amyrin synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **122**: 6816-6824
- KUZUYAMA, T. (2002): Mevalonate and nonmevalonate pathways for the biosynthesis of isoprene units. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 1619-1629
- LANGWORTHY, T.A., MAYBERRY, W.R., SMITH, P.F. (1976): A sulfonolipid and novel glucosamidyl glycolipids from the extreme thermoacidophile *Bacillus acidocaldarius*. *Biochim. Biophys. Acta* **431**: 550-569
- LANGWORTHY, T.A., MAYBERRY, W.R. (1976): A 1,2,3,4-tetrahydroxy pentane-substituted pentacyclic triterpene from *Bacillus acidocaldarius*. *Biochim. Biophys. Acta* **431**: 570-577
- LEE, S. (1891): Dictionary of national biography. London: Smith; Vol. 27
- LENHART, A., WEILHOFEN, W.A., PLESCHKE, A.E., SCHULZ, G.E. (2002): Crystal structure of a squalene cyclase in complex with the potential anticholesteremic drug Ro48-8071. *Chem. Biol.* **9**: 639-645
- LENHART, A., REINERT, D.J., AEBI, J.D., DEHMLOH, H., MORAND, O.H., SCHULZ, G.E. (2003): Binding structures and potencies of oxidosqualene cyclase inhibitors with the homologous squalene-hopene cyclase. *J. Med. Chem.* **46**: 2083-2092
- LESBURG, C.E., CARUTHERS, J.M., PASCHALL, C.M., CHRISTIANSON, D.W. (1998): Managing and manipulating carbocations in biology: Terpenoid cyclase structure and mechanism. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**: 695-703
- LICHTENTHALER, H.K. (1998): Der 1-Desoxy-D-xylulose-Biosyntheseweg pflanzlicher Isoprenoide. *Biospektrum* **4(2)**: 49-52
- LOIS, L.M., CAMPOS, N., PUTRA, S.R., DANIELSEN, K., ROHMER, M. (1998): Cloning and characterization of a gene from *Escherichia coli* encoding a transketolase-like enzyme that catalyzes the synthesis of D-1-deoxyxylulose 5-phosphate, a common precursor for isoprenoid, thiamin, and pyridoxal biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**: 2105-2110
- MADIGAN, M.T., MARRS, B.L. (1997): Extremophiles. *Sci. American* **1997(4)**: 66-71
- MALLORY, F.B., GORDON, J.T., CONNER, R.L. (1963): The isolation of a pentacyclic triterpenoid alcohol from a protozoan. *J. Am. Chem. Soc.* **85**: 1362-1363

- MASUDA, K., SHIOJIMA, K., AGETA, H. (1983): Fern constituents: Six tetracyclic triterpenoid hydrocarbons having different carbon-skeletons, isolated from *Lemmaphyllum microphyllum* var. *obovatum*. *Chem. Pharm. Bull.* **31**: 2530-2533
- MASUDA, K., SHIOJIMA, K., AGETA, H. (1989): Fern constituents: Two new malabaricatrienes isolated from *Lemmaphyllum microphyllum* var. *obovatum*. *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 1140-1142
- MCGARVEY, D.J., CROTEAU, R. (1995): Terpenoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1015-1026
- MERKOFER, T., PALE-GROSDEMANGE, C., WENDT, K.U., ROHMER, M., PORALLA, K. (1999): Altered product pattern of a squalene-hopene cyclase by mutagenesis of active site residues. *Tetrahedron Lett.* **40**: 2121-2124
- METHE, B.A., NELSON, K.E., EISEN, J.A., PAULSEN, I.T., NELSON, W., HEIDELBERG, J.F., WU, D., WARD, N., BEANAN, M.J., DODSON, R.J., MADUPU, R., BRINKAC, L.M., DAUGHERTY, S.C., DEBOY, R.T., DURKIN, A.S., GWINN, M., KOLONAY, J.F., SULLIVAN, S.A., HAFT, D.W., SELENGUT, J., DAVIDSEN, T.M., ZAFAR, N., WHITE, O., TRAN, B., ROMERO, C., FORBERGER, H.A., WEIDMAN, J., KHOURI, H., FELDBLYUM, T.V., UTTERBACK, T.R., VAN AKEN, S.E., LOVLEY, D.R., FRASER, C.M. (2003): Genome of *Geobacter sulfurreducens*: metal reduction in subsurface environments. *Science* **302**: 1967-1969
- MEYER, M.M., XU, R., MATSUDA, S.P. (2002): Directed evolution to generate cycloartenol synthase mutants that produce lanosterol. *Org. Lett.* **4**: 1395-1398
- MIEHE, H. (1907) Die Selbsterhitzung des Heus. G. Fischer, Jena
- MILLA, P., VIOLA, F., OLIARO BOSSO, S., ROCCO, F., CATTEL, L., JOUVERT, B.M., LECLAIR, R.J., MATSUDA, S.P., BALLIANO, G. (2002): Subcellular localization of oxidosqualene cyclases from *Arabidopsis thaliana*, *Trypanosoma cruzi* and *Pneumocystis carinii* expressed in yeast. *Lipids* **37**: 1171-1176
- MILLS, J.S., WERNER, A.E.A. (1955): The chemistry of Dammar resins. *J. Chem. Soc.* 3132-3140
- MOORE, B.S., PORALLA, K., FLOSS, H.G. (1993): Biosynthesis of the cyclohexanecarboxylic acid starter unit of ω -cyclohexyl fatty acids in *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *J. Am. Chem. Soc.* **115**: 5267-5274
- MOORE, B.S., FLOSS, H.G. (1994): Biosynthetic studies on the origin of the cyclohexanecarboxylic acid moiety of ansatrienin A and omega-cyclohexyl fatty acids. *J. Nat. Prod.* **57**: 382-386
- MORITA, M., SHIBUYA, M., LEE, M.-S., SANKAWA, U., EBIZUKA, Y. (1997): Molecular cloning of pea cDNA encoding cycloartenol synthase and its functional expression in yeast. *Biol. Pharm. Bull.* **20**: 770-775
- MORITA, M., SHIBUYA, M., KUSHIRO, T., MASUDA, K., EBIZUKA, Y. (2000): Molecular cloning and functional expression of triterpene synthases from Pea (*Pisum sativum*). New α -amyrin producing enzyme is a multifunctional triterpene synthase. *Eur. J. Biochem.* **267**: 3453-3460
- NAKAMURA, Y., KANEKO, T., SATO, S., IKEUCHI, M., KATOH, H., SASAMOTO, S., WATANABE, A., IRIGUCHI, M., KAWASHIMA, K., KIMURA, T., KISHIDA, Y., KIYOKAWA, C., KOHARA, M., MATSUMOTO, M., MATSUNO, A., NAKAZAKI, N., SHIMPO, S., SUGIMOTO, M., TAKEUCHI, C., YAMADA, M., TABATA, S. (2002): Complete genome

- structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Res.* **9**: 123-130
- NAKAMURA, Y., KANEKO, T., SATO, S., MIMURO, M., MIYASHITA, H., TSUCHIYA, T., SASAMOTO, S., WATANABE, A., KAWASHIMA, K., KISHIDA, Y., KIYOKAWA, C., KOHARA, M., MATSUMOTO, M., MATSUNO, A., NAKAZAKI, N., SHIMPO, S., TAKEUCHI, C., YAMADA, M., TABATA, S. (2003): Complete genome structure of *Gloeobacter violaceus* PCC 7421, a cyanobacterium that lacks thylakoids. *DNA Res.* **10**: 137-145
- NAKANO, S., OHASHI, S., HOSHINO, T. (2004): Squalene-hopene cyclase: insight into the role of the methyl group on the squalene backbone upon the polycyclization cascade. Enzymatic cyclization products of squalene analogs lacking a 26-methyl group and possessing a methyl group at C(7) or C(11). *Org. Biomol. Chem.* **2**: 2012-2022
- NES, W.R., MCKEAN, M.L. (1977): Biochemistry of steroids and other isoprenoids. University Park Press. Baltimore
- NEUMANN, S., SIMON, H. (1986): Purification, partial characterization and substrate specificity of a squalene cyclase from *Bacillus acidocaldarius*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **367**: 723-729
- NG, W.V., KENNEDY, S.P., MAHAIRAS, G.G., BERQUIST, B., PAN, M., SHUKLA, H.D., LASKY, S.R., BALIGA, N.S., THORSSON, V., SBROGNA, J., SWARTZELL, S., WEIR, D., HALL, J., DAHL, T.A., WELTI, R., GOO, Y.A., LEITHAUSER, B., KELLER, K., CRUZ, R., DANSON, M.J., HOUGH, D.W., MADDOCKS, D.G., JABLONSKIS, P.E., KREBS, M.P., ANGEVINE, C.M., DALE, H., ISENBARGER, T.A., PECK, R.F., POHLSCHRODER, M., SPUDICH, J.L., JUNG, K.-H., ALAM, M., FREITAS, T., HOU, S., DANIELS, C.J., DENNIS, P.P., OMER, A.D., EBHARDT, H., LOWE, T.M., LIANG, P., RILEY, M., HOOD, L., DASSARMA, S. (2000): Genome sequence of *Halobacterium* species NRC-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 12176-12181
- NORMAN, A.G., RICHARDS, L.A., CARLYLE, R.E. (1941): Microbial thermogenesis in the decomposition of plant materials, Part 1, An adiabatic fermentation apparatus. *J. Bacteriol.* **41**: 689-697
- OCHS, D. (1990): Squalen-Hopen-Cyclase aus *Bacillus acidocaldarius*. Reinigung, Klonierung und Sequenzierung. Dissertation. Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- OCHS, D., KALETTA, C., ENTIAN, K.-D., BECK-SICKINGER, A., PORALLA, K. (1992): Cloning, expression and sequencing of squalene-hopene cyclase, a key enzyme in triterpenoid metabolism. *J. Bacteriol.* **174**: 298-302
- OURISSON, G., ROHMER, M., ALBRECHT, P. (1984): The microbial origin of fossil fuels. *Sci. American* **251**: 44-51
- OURISSON, G., ROHMER, M., PORALLA, K. (1987): Prokaryotic hopanoids and other polyterpenoid sterol surrogates. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**: 301-333
- OURISSON, G. (1989): The evolution of terpenes to sterols. *Pure Appl. Chem.* **61**: 345-348
- OURISSON, G., ALBRECHT, P. (1992): The hopanoids I: geohopanoids: the most abundant natural products on earth. *Acc. Chem. Res.* **25**: 398-402
- OURISSON, G., ROHMER, M. (1992): The hopanoids II: biohopanoids: a novel class of bacterial lipids. *Acc. Chem. Res.* **25**: 403-408
- OURISSON, G., NAKTAMI, Y. (1994): The terpenoid theory of the origin of cellular life: the evolution of terpenoids to cholesterol. *Chemistry & Biology* **1**: 11-23

- PAGE, R.D.M. (1996): TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *CABIOS* **12**: 357-358
- PALE-GROSDÉMANGE, C., FEIL, C., ROHMER, M., PORALLA, K. (1998): Kationische Zwischenstufen und fehlerhafte Kontrolle während der enzymatischen Cyclisierung von Squalen zu Hopanoiden. *Angew. Chemie* **110**: 2355-2358
- PALE-GROSDÉMANGE, C., MERKOFER, T., ROHMER, M., PORALLA, K. (1999): Production of bicyclic and tricyclic triterpenes by mutated squalene-hopene cyclase. *Tetrahedron Lett.* **40**: 6009-6012
- PEARSON, A., BUDIN, M., BROCKS, J.J. (2003): Phylogenetic and biochemical evidence for sterol synthesis in the bacterium *Gemmata obscuriglobus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 15352-15357
- PERZL, M. (1996): Biochemische und molekularbiologische Untersuchungen zur Hopanoid-Biosynthese in *Bradyrhizobium* und zur Tetrahymanol-Biosynthese im Ciliaten *Tetrahymena*. Dissertation. Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- PERZL, M., MÜLLER, P., PORALLA, K., KANNENBERG, E.L. (1997): Squalene-hopene cyclase from *Bradyrhizobium japonicum*: cloning, expression, sequence analysis and comparison to other triterpenoid cyclases. *Microbiol.* **143**: 1235-1242
- PERZL, M., REIPEN, I.G., SCHMITZ, S., PORALLA, K., SAHM, H., SPRENGER, G.A., KANNENBERG, E.L. (1998): Cloning of conserved genes from *Zymomonas mobilis* and *Bradyrhizobium japonicum* that function in the biosynthesis of hopanoid lipids. *Biochim. Biophys. Acta* **1393**: 108-118
- PETERSON, L. (1977): A simplification of the protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* **83**: 346-356
- PORALLA, K., KANNENBERG, E., BLUME, A. (1980): A glycolipid isolated from the acidophilic, thermophilic *Bacillus acidocaldarius*, has a cholesterol-like function in membranes. *FEBS Lett.* **113**: 107-110
- PORALLA, K. (1982): Considerations on the evolution of steroids as membrane components. *FEMS Microbiol. Lett.* **13**: 131-135
- PORALLA, K., HÄRTNER, T., KANNENBERG, E. (1984): Effect of temperature and pH on the hopanoid content of *Bacillus acidocaldarius*. *FEMS Microbiol. Lett.* **23**: 253-256
- PORALLA, K. (1994): The possible role of a repetitive amino acid motif in evolution of triterpenoid cyclases. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **4**: 285-290
- PORALLA, K., HEWELT, A., PRESTWICH, G.D., ABE, I., REIPEN, I.G., SPRENGER, G. (1994): A specific amino acid repeat in squalene and oxidosqualene cyclases. *TIBS* **19**: 157-158
- PORALLA, K. (1999): Cycloartenol and other triterpene cyclases. In: BARTON, D., NAKANSHI, K. (Hrsg.) *Comprehensive natural product chemistry*. Vol. 2: Isoprenoids including carotenoids and steroids. 299-319. Elsevier, Amsterdam
- PORALLA, K., MUTH, G., HÄRTNER, T. (2000): Hopanoids are formed during transition from substrate to aerial hyphae in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol Lett.* **189**: 93-95
- PORALLA, K. (2004): Profound insights into squalene cyclization. *Chem. Biol.* **11**: 12-14
- PRINCE, R.C. (1984): Hopanoids: The world's most abundant biomolecules? *Trends Biochem. Sci.* **12**: 455-456

- RAHN, A. (1996): Versuche zur Klonierung und Sequenzierung der Squalen-Hopen-Cyclase aus *Rhodopseudomonas palustris*. Diplomarbeit. Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- RAJAMANI, R., GAO, J. (2003): Balancing kinetic and thermodynamic control: the mechanism of carbocation cyclization by squalene cyclase. *J. Am. Chem. Soc.* **125**: 12768-12781
- READ, T., PETERSON, S., TOURASSE, N., BAILLIE, L., PAULSEN, I., NELSON, K., TETTELIN, H., FOUTS, D., EISEN, J., GILL, S., HOLTZAPPLE, E., OKSTAD, O., HELGASON, E., RILSTONE, J., WU, M., KOLONAY, J., BEANAN, M., DODSON, R., BRINKAC, L., GWINN, M., DEBOY, R., MADUPU, R., DAUGHERTY, S., DURKIN, A., HAFT, D., NELSON, W., PETERSON, J., POP, M., KHOURI, H., RADUNE, D., BENTON, J., MAHAMOUD, Y., JIANG, L., HANCE, I., WEIDMAN, J., BERRY, K., PLAUT, R., WOLF, A., WATKINS, K., NIERMAN, W., HAZEN, A., CLINE, R., REDMOND, C., THWAITE, J., WHITE, O., SALZBERG, S., THOMASON, B., FRIEDLANDER, A., KOEHLER, T., HANNA, P., KOLSTO, A.-B., FRASER, C. (2003) The genome sequence of *Bacillus anthracis* Ames and comparison to closely related bacteria. *Nature* **423**: 81-86
- REINERT, D.J., BALLIANO, G., SCHULZ, G.E. (2004): Conversion of squalene to pentacarbocyclic hopene. *Chem. Biol.* **11**: 121-126
- REIPEN, I.G., PORALLA, K., SAHM, H., SPRENGER, G.A. (1995): *Zymomonas mobilis* squalene-hopene cyclase gene (shc): cloning, DNA sequence analysis, and expression in *Escherichia coli*. *Microbiol.* **141**: 155-161
- ROHMER, M., OURISSON, G. (1976): Structure des bactériohopanétrols d'*Acetobacter xylinum*. *Tetrahedron Lett.* **19**: 3633-3636
- ROHMER, M., BOUVIER, P., OURISSON, G. (1979): Molecular evolution of biomembranes: structural equivalents and phylogenetic precursors of sterols. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 847-851
- ROHMER, M., BOUVIER, P., OURISSON, G. (1980): Non-specific lanosterol and hopanoid biosynthesis by a cell-free system from the bacterium *Methylococcus capsulatus*. *Eur. J. Biochem.* **112**: 557-560
- ROHMER, M., BOUVIER-NAVE, P., OURISSON, G. (1984): Distribution of hopanoid triterpenes in prokaryotes. *J. Gen. Microbiol.* **130**: 1137-1150
- ROHMER, M., KNANI, M., SIMONIN, P., SUTTER, B., SAHM, H. (1993): Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochem. J.* **295**: 517-524
- ROHMER, M., SEEMANN, M., HORBACH, S., BRINGER-MEYER, S., SAHM, H. (1996): Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *J. Am. Chem. Soc.* **118**: 2564-2566
- RUF, A., MÜLLER, F., D'ARCY B., STIHLE, M., KUSZNIR, E., HANDSCHIN, C., MORAND, O.H., THOMA, R. (2004): The monotopic membrane protein human oxidosqualene cyclase is active as monomer. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **315**: 247-254
- SAAR, J. (1989): Reinigung und Charakterisierung der Squalen-Tetrahymanol-Cyclase des Ciliaten *Tetrahymena thermophila*. Dissertation. Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

- SAAR, J., KADER, J.-C., PORALLA, K., OURISSON, G. (1991): Purification and some properties of the squalene-tetrahymanol cyclase from *Tetrahymena thermophila*. *Biochim. Biophys. Acta* **1075**: 93-101
- SADOWSKI, J., GASTEIGER, J., KLEBE, G. (1994): Comparison of automatic three-dimensional model builders using 639 X-ray structures. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **34**: 1000-1008
- SAHM, H., ROHMER, M., BRINGER-MEYER, S., SPRENGER, G.A., WELLE, R. (1993): Biochemistry and physiology of hopanoids in bacteria. *Adv. Microbial Physiol.* **35**: 247-273
- SAITOU, N., NEI, M. (1987): The neighbor joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425
- SAMBROOK, J., MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. (1989): Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, N.Y.
- SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **74**: 5463-5467
- SATO, T., KANAI, Y., HOSHINO, T. (1998a): Overexpression of squalene-hopene cyclase by the pET vector in *Escherichia coli* and first identification of tryptophane and aspartic acid residues inside the QW motif as active sites. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **62**: 407-411
- SATO, T., ABE, T., HOSHINO, T. (1998b): On the cyclization mechanism of squalene: a ring expansion process of the five-membered D-ring intermediate. *Chem. Comm.* **1998**: 2617-2718
- SATO, T., HOSHINO, T. (1999a): Kinetic studies on the function of all the conserved tryptophans involved inside and outside the QW motifs of squalene-hopene cyclase: stabilizing effect of the protein structure against thermal denaturation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 1171-1180
- SATO, T., HOSHINO, T. (1999b): Functional analysis of the DXDDTA motif in squalene-hopene cyclase by site-directed mutagenesis experiments: initiation site of the polycyclization reaction and stabilization site of the carbocation intermediate of the initially cyclized A-ring. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**: 2189-2198
- SATO, T., HOSHINO, T. (2001): Catalytic function of the residues of phenylalanine and tyrosine conserved in squalene-hopene cyclase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 2233-2242
- SATO, T., SASAHARA, S., YAMAKAMI, T., HOSHINO, T. (2002). Functional analyses of Tyr420 and Leu607 of *Alicyclobacillus acidocaldarius* squalene-hopene cyclase. Neochillapentane, a novel triterpene with the 1,5,6-trimethylcyclohexene moiety produced through folding of the constrained boat structure. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 1660-1670
- SATO, T., KOUUDA, M., HOSHINO, T. (2004). Site-directed mutagenesis experiment on the putative deprotonation site of squalene-hopene cyclase from *Alicyclobacillus acidocaldarius*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**: 728-738
- SAYLE R., MILNER-WHITE, E.J. (1995): RasMol: Biomolecular graphics for all. *TIBS* **20**: 374-376

- SCHMITZ, S. (2000): Charakterisierung des Hopanoidbiosynthese-Operons aus *Bradyrhizobium japonicum* und der Squalen-Hopen-Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius*. Dissertation. Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- SCHMITZ, S., FÜLL, C., GLASER, T., ALBERT, K., PORALLA, K. (2001): Specific production of γ -polypodatetraene or 17-isodammara-20(21),24-diene by squalene-hopene cyclase mutant. *Tetrahedron Lett.* **42**: 883-885
- SCHNAITHMANN, C.A. (1971): Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *J. Bacteriol.* **108**: 545-552
- SCHOPF, J.W. (1993): Microfossils of the Early Archean Apex chert: New evidence of the antiquity of life. *Science.* **260**: 640-646
- SCHOPF, J.W. (1999): Cradle of life: The discovery of earth's earliest fossils. Princeton University Press, Princeton
- SCHOPF, J.W. (2002): When did life begin? In: SCHOPF, J.W. (Hrsg.): Life's origin: The beginnings of biological evolution. University of California Press, Berkeley & Los Angeles
- SCHULZ-GASCH, T., STAHL, M. (2003): Mechanistic insights into oxidosqualene cyclization through homology modeling. *J. Comput. Chem.* **24**: 741-753
- SCHWERMANN, B., PFAU, K., LILIENSIEK, B., SCHLEYER, M., FISCHER, T., BAKKER, E.P. (1994): Purification, properties and structural aspects of a thermoacidophilic α -amylase from *Alicyclobacillus acidocaldarius* ATCC 27009. Insight into acidostability of proteins. *Eur. J. Biochem.* **226**: 981-991
- SECKLER, B. (1984): Squalen-Hopen-Cyclase aus *Bacillus acidocaldarius*. Charakterisierung und Anreicherung. Dissertation. Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- SECKLER, B., PORALLA, K. (1986): Characterization and partial purification of squalene-hopene cyclase from *Bacillus acidocaldarius*. *Biochim. Biophys. Acta* **881**: 356-363
- SEEMANN, M., BUI, B.T.S., WOLFF, M., TRITSCH, D., CAMPOS, N., BORONAT, A., MARQUET, A., ROHMER, M. (2002): Isoprenoid biosynthesis through the methylerythritol phosphate pathway: The (*E*)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (GcpE) is a [4Fe-4S] protein. *Angew. Chemie Int. Ed.* **41**: 4337-4339
- SEGURA, M.J., LODEIRO, S., MEYER, M.M., PATEL, A.J., MATSUDA, S.P. (2002): Directed evolution experiments reveal mutations at cycloartenol synthase residue His477 that dramatically alter catalysis. *Org Lett.* **12**: 4459-4462
- SHANKARAPPA, B., SIRKO, D.A., EHRLICH, G.D. (1992a): A general method for the identification of regions suitable for site-directed silent mutagenesis. *BioTechniques* **12**: 382-384
- SHANKARAPPA, B., VIJAYANANDA, K., EHRLICH, G.D. (1992b): SILMUT: A computer program for the identification of regions suitable for silent mutagenesis to introduce restriction enzyme recognition sequences. *BioTechniques* **12**: 882-884.
- SHIBUYA, M., ZHANG, H., ENDO, A., SHISHIKURA, K., KUSHIRO, T., EBIZUKA, Y. (1999): Two branches of the lupeol synthase gene in the molecular evolution of plant oxidosqualene cyclases. *Eur. J. Biochem.* **266**: 302-307
- SHIOJIMA, K., ARAI, Y., MASUDA, K., KAMADA, T., AGETA, H. (1983): Fern constituents: Polypodatetraenes, novel bicyclic triterpenoids, isolated from polypodiaceous and aspidiaceous plants. *Tetrahedron Lett.* **24**: 5733-5736

- SLESAREV, A.I., MEZHEVAYA, K.V., MAKAROVA, K.S., POLUSHIN, N.N., SHCHERBININA, O.V., SHAKHOVA, V.V., BELOVA, G.I., ARAVIND, L., NATALE, D.A., ROGOZIN, I.B., TATUSOV, R.L., WOLF, Y.I., STETTER, K.O., MALYKH, A.G., KOONIN, E.V., KOZYAVKIN, S.A. (2002): The complete genome of hyperthermophilic *Methanopyrus kandleri* AV19 and monophyly of archaeal methanogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 4644-4649
- SUMMONS, R.E., JAHNKE, L.L., HOPE, J.M., LOGAN, G.A. (1999): 2-Methylhopanoids as biomarkers for cyanobacterial oxygenic photosynthesis. *Nature* **400**: 554-557
- STEELE, C.L., CROCK, J., BOHLMANN, J., CROTEAU, R. (1998): Sesquiterpene synthases from grand fir (*Abies grandis*). *J. Biol. Chem.* **273**: 2078-2089
- STRAUSBERG, R.L., FEINGOLD, E.A., GROUSE, L.H., DERGE, J.G., KLAUSNER, R.D., COLLINS, F.S., WAGNER, L., SHENMEN, C.M., SCHULER, G.D., ALTSCHUL, S.F., ZEEBERG, B., BUETOW, K.H., SCHAEFER, C.F., BHAT, N.K., HOPKINS, R.F., JORDAN, H., MOORE, T., MAX, S.I., WANG, J., HSIEH, F., DIATCHENKO, L., MARUSINA, K., FARMER, A.A., RUBIN, G.M., HONG, L., STAPLETON, M., SOARES, M.B., BONALDO, M.F., CASAVANT, T.L., SCHEETZ, T.E., BROWNSTEIN, M.J., USDIN, T.B., TOSHIYUKI, S., CARNINCI, P., PRANGE, C., RAHA, S.S., LOQUELLANO, N.A., PETERS, G.J., ABRAMSON, R.D., MULLAHY, S.J., BOSAK, S.A., MCEWAN, P.J., MCKERNAN, K.J., MALEK, J.A., GUNARATNE, P.H., RICHARDS, S., WORLEY, K.C., HALE, S., GARCIA, A.M., GAY, L.J., HULYK, S.W., VILLALON, D.K., MUZNY, D.M., SODERGREN, E.J., LU, X., GIBBS, R.A., FAHEY, J., HELTON, E., KETTEMAN, M., MADAN, A., RODRIGUES, S., SANCHEZ, A., WHITING, M., MADAN, A., YOUNG, A.C., SHEVCHENKO, Y., BOUFFARD, G.G., BLAKESLEY, R.W., TOUCHMAN, J.W., GREEN, E.D., DICKSON, M.C., RODRIGUEZ, A.C., GRIMWOOD, J., SCHMUTZ, J., MYERS, R.M., BUTTERFIELD, Y.S., KRZYWINSKI, M.I., SKALSKA, U., SMAILUS, D.E., SCHNERCH, A., SCHEIN, J.E., JONES, S.J., MARRA, M.A. (2002): Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**: 16899-16903
- SUNG, C.-K., SHIBUYA, M., SANKAWA, U., EBIZUKA, Y. (1995): Molecular cloning of cDNA encoding human lanosterol synthase. *Biol. Pharm. Bull.* **18**: 1459-1461
- TAPPE, C.H. (1993): Squalen-Hopen-Cyclasen: Reinigung, Charakterisierung und Inhibitor-Experimente. Dissertation. Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- TARSHIS, L.C., PROTEAU, P.J., KELLOGG, B.A., SACCHETTINI, J.C., POULTER, C.D. (1996): Regulation of product chain length by isoprenyl diphosphate synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**: 15018-15023
- TAYLOR, R.F. (1984): Bacterial Triterpenoids. *Microbiol. Rev.* **48**: 181-198
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G. (1997): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acid Res.* **25**: 4876-4882
- TIPPELT, A. (1997): Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Hopanoid-Biosynthese in *Methylococcus capsulatus* Bath. Dissertation. Fakultät für Biologie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- TIPPELT, A., JAHNKE, L., PORALLA, K. (1998): Squalene-hopene cyclase from *Methylococcus capsulatus* (Bath): a bacterium producing hopanoids and steroids. *Biochim. Biophys. Acta* **1391**: 223-232

- TOWBIN, H., STAEBLIN, T., GORDON, J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 4350-4354
- UCHINO, F., DOI, S. (1967): Acido-thermophilic bacteria from thermal waters. *Agr. Biol. Chem.* **31**: 817-822
- WENDT, K.U. (1994): Überexpression, Charakterisierung, Kristallisation und röntgenographische Untersuchung der Squalen-Hopen-Cyclase aus *Bacillus acidocaldarius*. Diplomarbeit. Fakultät für Chemie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
- WENDT, K.U. (1997): Kristallstrukturen der Squalen-Hopen-Cyclase aus *Alicyclobacillus acidocaldarius* (EC 5.4.99.x). Dissertation. Fakultät für Chemie und Pharmazie der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau
- WENDT, K.U., PORALLA, K., SCHULZ, G.E. (1997): Structure and function of a squalene cyclase. *Science* **277**: 1811-1815
- WENDT, K.U., SCHULZ, G.E. (1998): Isoprenoid biosynthesis: manifold chemistry catalyzed by similar enzymes. *Structure* **6**: 127-133
- WENDT, K.U., LENHART, A., SCHULZ, G.E. (1999): The structure of the membrane protein squalene-hopene cyclase at 2.0 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **286**: 2377-2389
- WENDT, K.U., SCHULZ, G.E., COREY, E.J., LIU, D.R. (2000): Mechanismen der enzymatischen Bildung polycyclischer Triterpene. *Angew. Chemie* **112**: 2930-2952
- WILLIS, K.J., MCELWAIN, J.C. (2002) The evolution of plants. Oxford University Press, Oxford
- WISOTZKEY, J.D., JURTSCHUK JR., P., FOX, G.E., DEINHARD, G., PORALLA, K. (1992): Comparative sequence analysis on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris* and *Bacillus cycloheptanicus* and proposal for the creation of the new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int. J. Syst. Bact.* **42**: 263-269
- WOESE, C.R. (1987): Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271
- WOESE, C.R., KANDLER, O., WHEELIS, M.L. (1990): Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria and Eukarya. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**: 4576-4579
- WOLFF, M., SEEMANN, M., BUI B.T.S., FRAPART, Y., TRITSCH, D., ESTRABOT, A.G., RODRIGUEZ-CONCEPCION, M., BORONAT, A., MARQUET, A., ROHMER, M. (2003): Isoprenoid biosynthesis via the methylerythritol phosphate pathway: the (E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (LytB/IspH) from *Escherichia coli* is a [4Fe-4S] protein. *FEBS Lett.* **541**: 115-120
- WU, T.K., GRIFFIN, J.H. (2002): Conversion of a plant oxidosqualene-cycloartenol synthase to an oxidosqualene-lanosterol cyclase by random mutagenesis. *Biochemistry* **41**: 8238-8244
- WU, T.K., HUANG, C.Y., KO, C.Y., CHANG, C.H., CHEN, Y.J., LIAO, H.K. (2004): Purification, tandem mass characterization, and inhibition studies of oxidosqualene-lanosterol cyclase enzyme from bovine liver. *Arch. Biochem. Biophys.* **421**: 42-53
- YANISH-PERRON, C., VIEIRA, J., MESSING, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13 mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119

- YOU, S., KAWANO, N., ICHINOSE, K., YAO, X., EBIZUKA, Y. (1999): Molecular cloning and sequencing of an *Allium macrostemon* cDNA probably encoding oxidosqualene cyclase. *Plant Biotechnol.* **16**: 311-314
- ZANDER, J.M., CASPI, E., PANDEY, G.N., MITRA, C.R. (1969): The presence of tetrahymanol in *Oleandra wallichii*. *Phytochemistry* **8**: 2265-2267
- ZELL, R., FRITZ, H. (1987): DNA mismatch repair in *Escherichia coli* counteracting the hydrolytic deamination of 5-methyl-cytosine residues. *EMBO J.* **6**: 1809-1815
- ZHANG, H., SHIBUYA, M., EBIZUKA, Y., YOKOTA, S. (2003): Oxidosqualene cyclases from cell suspension cultures of *Betula platyphylla* var. *japonica*: Molecular evolution of oxidosqualene cyclases in higher plants. *Biol. Pharm. Bull.* **26**: 642-650