

**Reinigung der Vinorin-Synthase aus Zellkulturen
von *Rauvolfia serpentina***

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität
in Mainz

Annette Goldhammer
geb. in Zittau

Mainz 2001

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2001

Für meine Mutter

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
1	Proteinbegriff und Strukturaufklärung von Proteinen	1
2	Erforschung von Biosynthesewegen	5
3	<i>Rauvolfia serpentina</i> – Historie einer alten Medizinalpflanze	8
4	Biosynthese von Ajmalin.....	10
5	Ziel der Arbeit	17
II	MATERIAL	18
1	Pflanzliche Zellkulturen	18
2	Kulturmedium.....	19
3	Fertigsäulen/Säulenmaterialien/Leersäulen	19
4	Spezielle Chemikalien und Zubehör	19
5	Geräte.....	20
III	METHODEN	23
1	Proteinreinigung	23
1.1	Präparation von Enzymrohextrakten	23
1.2	Konzentrieren, Entsalzen und Umpuffern von Enzymlösungen	24
1.2.1	Dialyse	24
1.2.2	Konzentrieren von Proteinlösungen großer Volumina	25
1.2.3	Konzentrieren von Proteinmengen kleiner Volumina	25
1.3	Gehaltsbestimmung von Proteinlösungen.....	26
1.4	Chromatographische Methoden	26
1.4.1	Anionenaustauschchromatographie.....	27
1.4.1.1	Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q	27
1.4.1.2	Anionenaustauschchromatographie an Mono Q.....	28

1.4.2	Hydrophobe Interaktionen Chromatographie (HIC) an SOURCE 15PHE	29
1.4.3	Chromatographie an Macro-PrepCeramic Hydroxyapatite (CHT)	30
1.4.4	Chromatofokussierung an Mono P	31
1.4.5	Größenausschlußchromatographie an Superdex 75.....	32
1.4.6	Weitere getestete Chromatographiemethoden	33
1.4.6.1	Kationenaustauschchromatographie	34
1.4.6.2	Affinitätschromatographie an Coenzym-A-Agarose	34
1.5	Elektrophoretische Methoden.....	35
1.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
1.5.2	Basische Nativgelelektrophorese (BNE)	38
1.5.3	Kombination SDS-PAGE und BNE	40
1.5.4	Färbemethoden.....	40
1.5.4.1	Coomassie-Färbung	40
1.5.4.2	Silberfärbung	41
2	Bestimmung der Enzymaktivität.....	42
2.1	Enzymtest mit Gardneral als Substrat.....	42
2.2	Enzymtest mit 16-epi-Vellosimin als Substrat	43
2.2.1	Enzymtest zur Bestimmung der Aktivität der PNA-Esterase ..	44
2.2.2	Enzymtest zur Bestimmung der Aktivität der Vinorin-Synthase mit 16-epi-Vellosimin als Substrat.....	45
2.3	Enzymtest zur Bestimmung der Enzymaktivität in BNE-Gelen	46
3	Bestimmung von Molekulargewichten.....	46
3.1	Größenausschlußchromatographie.....	47
3.2	SDS-PAGE.....	48
4	Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	49
5	Synthese von Polyneuridinaldehyd aus Quebrachidin.....	50

IV	ERGEBNISSE	51
1	Nachweis der Vinorin-Synthase.....	51
1.1	Enzymtest mit dem Substrat 16-epi-Vellosimin	51
1.2	Entwicklung eines Enzymtests mit dem Substrat Gardneral	55
2	Reinigung der Vinorin-Synthase.....	58
2.1	Herstellung eines Proteinrohextraktes und fraktionierte Ammoniumsulfatfällung	59
2.2	Chromatographische Trennungen.....	59
2.2.1	Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q.....	60
2.2.2	Hydrophobe Interaktionen Chromatographie (HIC) an SOURCE 15PHE	62
2.2.3	Chromatographie an Macro-PrepCeramic Hydroxyapatite (CHT)	64
2.2.4	Chromatofokussierung an Mono P.....	66
2.2.5	Anionenaustauschchromatographie an Mono Q	67
2.2.6	Größenausschlußchromatographie an Superdex 75.....	69
2.2.7	Weitere getestete Chromatographiematerialien	71
2.2.7.1	Kationenaustauschchromatographie	71
2.2.7.2	Affinitätschromatographie an Coenzym-A-Agarose	71
2.3	Untersuchungen zur Identifizierung der Vinorin-Synthase in SDS- Gelen	72
2.3.1	Gelelektrophoretische Reinheitskontrolle.....	72
2.3.2	Kombination von BNE und SDS-PAGE zur Identifizierung der Vinorin-Synthase.....	73
2.3.2.1	Basische Nativgelelektrophorese (1. Dimension)	74
2.3.2.2	SDS-PAGE (2. Dimension).....	75
2.3.2.3	Proteolytische Spaltung und Bestimmung von Peptidsequenzen	77
2.3.2.4	Homologievergleich der Peptide	78
2.3.3	Test verschiedener Zelllinien auf Vinorin-Synthase-Aktivität ..	81
2.4	Kurzreinigungsschema zur Bestimmung des Molekulargewichts mittels Größenausschlußchromatographie an Superdex 75	84

2.5	Optimiertes, allgemeines Reinigungsschema	87
3	Bestimmung des Molekulargewichts der Vinorin-Synthase	90
V	DISKUSSION	91
1	Bisherige Forschungsergebnisse zur Vinorin-Synthase.....	91
2	Enzymatisch unabhängige Reaktion von 16-epi-Vellosimin und Gardneral	94
3	Mechanismus der enzymatischen Reaktion	96
4	Proteinreinigung	103
5	Ausblick	109
VI	ZUSAMMENFASSUNG.....	115
VII	LITERATURVERZEICHNIS	117

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Für die Bezeichnung der Aminosäuren wurde der Einbuchstaben-Code verwendet.

% (m/V)	Massenprozent (g in 100 ml Lösung)
% V/V)	Volumenprozent (ml in 100 ml Lösung)
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)-aminotris-(hydroxymethyl)-methan
BNE	Basische Nativgelelektrophorese
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
C(%)	Vernetzerkonzentration, bezogen auf die Gesamtmenge T
CHT	Macro-PrepCeramic Hydroxyapatite
CV	Säulenvolumen (column volume)
g	Gravitationskonstante (g = 9.81 m·s ⁻²)
HCl	Salzsäure
HIC	Hydrophobe Interaktionen Chromatographie (Hydrophobic Interaction Chromatography)
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
Kat	Katal, Enzymaktivität (Umsatz von 1 mol Substrat pro s)
kD	Kilo-Dalton
K _M	Michaelis-Menten-Konstante
KPi	Kaliumphosphat
LMW	Markerproteinmischung (Low Molecular Weight)
Lux	Beleuchtungsstärke

MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
MSH	β -Mercaptoethanol
Na(BH) ₄	Natriumborhydrid
NaAc	Natriumacetat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
pI	Isoelektrischer Punkt
PNA	Polyneuridinaldehyd
rel.	relativ
RP	Reversed Phase
Rt	Retentionszeit
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecylsulfate)
spez.	spezifisch
T(%)	Konzentration an Acrylamid und Vernetzer in einem Polyacrylamidgel
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolettes Licht
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	Anwendungen der Biosyntheseforschung.....	6
Abbildung 2:	Strukturformel von Ajmalin	10
Abbildung 3:	Enzymatische Biosynthese von Ajmalin in <i>Rauvolfia serpentina</i>	14
Abbildung 4:	HPLC-Chromatogramm zur Aktivitätsbestimmung der Vinorin- Synthase mit dem Substrat 16-epi-Vellosimin.....	53
Abbildung 5:	Im Testansatz zur Bestimmung der Enzymaktivität mit 16-epi- Vellosimin enthaltene Alkaloide und deren Reduktionsprodukte mit NaBH ₄	54
Abbildung 6:	HPLC-Chromatogramm zur Aktivitätsbestimmung der Vinorin- Synthase mit dem Substrat Gardneral	56
Abbildung 7:	Im Testansatz zur Bestimmung der Enzymaktivität mit Gardneral enthaltene Alkaloide und deren Reduktionsprodukte mit NaBH ₄	57
Abbildung 8:	Reinigung der Vinorin-Synthase – Elutionsprofil der Anionenaustausch- chromatographie an SOURCE 30Q.....	61
Abbildung 9:	Reinigung der Vinorin-Synthase – Elutionsprofil der Hydrophobe Interaktionen Chromatographie (HIC) an SOURCE 15PHE	63
Abbildung 10:	Reinigung der Vinorin-Synthase – Elutionsprofil der Chromatographie an Macro-PrepCeramic Hydroxyapatite.....	65
Abbildung 11:	Reinigung der Vinorin-Synthase – Elutionsprofil der Chromatofokussierung an Mono P	67
Abbildung 12:	Reinigung der Vinorin-Synthase – Elutionsprofil der Chromatographie an Mono Q.....	68
Abbildung 13:	Reinigung der Vinorin-Synthase – Elutionsprofil der Chromatographie an Superdex 75	70
Abbildung 14:	SDS-Gel der angereicherten Proteinfractionen.....	73
Abbildung 15:	Schema der Auftragung und weiteren Bearbeitung der Gelstücke	75

Abbildung 16: SDS-Gel (2. Dimension) nach BNE (1. Dimension) zur Identifizierung der Vinorin-Synthase	76
Abbildung 17: SDS-Gel nach Reinigungsprotokoll zum Vergleich verschiedener Zelllinien	83
Abbildung 18: SDS-Gel und Enzymaktivitätsverlauf nach Größenausschlußchromatographie.....	86
Abbildung 19: Kalibrierungskurve für die Molekulargewichtsbestimmung an Superdex 75.....	90
Abbildung 20: Enzymatisch katalysierte Bildung von Vinorin aus 16-epi-Vellosimin.....	91
Abbildung 21: Epimerisierung von 16-epi-Vellosimin	94
Abbildung 22: Reaktionsmechanismus der nicht-enzymatischen Bildung von 17-Deacetyl-Vinorin aus 16-epi-Vellosimin	96
Abbildung 23: Biosynthese von Alkaloiden des Ajmalan- und Sarpagan-Typs ausgehend vom 16-epi-Vellosimin	97
Abbildung 24: Berechnung der freien Standardenergie ΔG° und der Gleichgewichtskonstanten K' für die Bildung des Enzym-Acetyl-Komplexes	99
Abbildung 25: Postulierter Reaktionsmechanismus der enzymatischen, Acetyl-Coenzym-A-abhängigen Bildung von Vinorin aus 16-epi-Vellosimin.....	100
Abbildung 26: Elutionsprofile und meßbare resultierende Aktivität bei der Annahme zweier Enzyme durch vollständige oder überlappende Trennung der postulierten Acetyl-Transferase-Aktivität von der 17-Deacetyl-Vinorin-Synthase-Aktivität	101
Abbildung 27: Postulierter Reaktionsablauf von 16-epi-Vellosimin zu Vinorin katalysiert durch ein Enzym mit zwei Domänen.....	113

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Enzyme der Ajmalinbiosynthese in <i>Rauvolfia serpentina</i>	15
Tabelle 2: Pipettierschema zur Bestimmung der Enzymaktivität - Substrat Gardneral	43
Tabelle 3: Pipettierschema zur Bestimmung der Enzymaktivität der PNA- Esterase	44
Tabelle 4: Pipettierschema zur Bestimmung der Enzymaktivität der Vinorin- Synthase - Substrat 16-epi-Vellosimin.....	45
Tabelle 5: Pipettierschema zur Bestimmung der Enzymaktivität in BNE- Gelen.....	46
Tabelle 6: Zusammensetzung der Markerproteinmischung für die Größenausschlußchromatographie	47
Tabelle 7: Zusammensetzung der Markerproteinmischung LMW Electrophoresis Calibration Kit	48
Tabelle 8: Ermittelte Aminosäuresequenzen von Oligopeptiden, erhalten nach Verdau der Bande, die als Vinorin-Synthase angesehen wurde.....	78
Tabelle 9: Sequenzvergleich der Peptide.....	79
Tabelle 10: Reinigungsschema für das Testen verschiedener Zelllinien	82
Tabelle 11: Kurzreinigungsschema zur Bestimmung des Molekulargewichts	84
Tabelle 12: Optimiertes Reinigungsschema zur Reinigung der Vinorin- Synthase	88
Tabelle 13: Reinigungsprotokoll zur Anreicherung der Vinorin-Synthase von <i>Rauvolfia-serpentina</i> -Zellkulturgewebe	89
Tabelle 14: Substratspezifität der Vinorin-Synthase.....	93
Tabelle 15: Vergleichende Darstellung der spezifischen Aktivitäten und Anreicherungsfaktoren bei der Reinigung der Vinorin-Synthase, Raucaffricin-Glucosidase und PNA-Esterase	106

I EINLEITUNG

1 Proteinbegriff und Strukturaufklärung von Proteinen

Der Begriff „Protein“ wurde von dem schwedischen Chemiker BERZELIUS schon im Jahre 1838 geprägt und von dem holländischen Chemiker MULDER zusammen mit einer spezifischen Summenformel ($C_{40}H_{62}N_{10}O_{12}$) publiziert. Abgeleitet wurde das Wort „Protein“ vom griechischen Wort *proteios* („erstrangig“, „von höchster Wichtigkeit“), um die Bedeutung der Stoffgruppe Proteine, der „ohne jeden Zweifel wichtigsten aller Substanzen der organischen Materie“ und „ohne die wahrscheinlich kein Leben auf unserem Planeten existieren würde“, zu betonen.^[1]

In der Tat spielen Proteine in praktisch allen biologischen Prozessen eine entscheidende Rolle. Sie erfüllen die Funktion biologischer Katalysatoren, sind an der Regulation des Zellstoffwechsels und der Interaktion zwischen den Zellen beteiligt und werden für den Aufbau spezifischer Strukturen benötigt.

Bereits 50 Jahre vor BERZELIUS beschäftigte sich die Wissenschaft mit der Untersuchung von Struktur und Funktion von Proteinen. So wurde schon 1787 über die Reinigung von gerinnbaren, eiweißartigen Substanzen aus Pflanzen berichtet. Bei der Reinigung und Analyse von Proteinen wie Albumin, Fibrin und Casein im frühen 19. Jahrhundert zeigte sich, daß Proteine erheblich komplizierter aufgebaut sind als die damals bekannten anderen organischen Moleküle.^[2]

Mit dem zunehmenden Interesse an den Stoffwechselprozessen der lebenden Materie erkannte man, daß fast alle Reaktionsschritte in Organismen durch Enzyme katalysiert werden. Als sich schließlich herausstellte, daß die Enzyme, zumindest im wesentlichen, ebenfalls Proteinstruktur aufweisen,

vergrößerte sich das Interesse, den allgemeinen Bauplan dieser Naturstoffklasse aufzuklären. Einen weiteren wesentlichen Schritt auf diesem Weg leistete FISCHER 1905, der erkannte, daß ein Protein ein Makromolekül ist, aufgebaut aus Aminosäuren, die durch Säureamidbindungen verknüpft sind. Somit war das allgemeine Strukturprinzip der Proteine bekannt. Unbekannt war jedoch noch, aus *welchen* Aminosäuren Proteine aufgebaut sind. Bis 1940 konnte gezeigt werden, daß die meisten Proteine aller Lebewesen aus nur 20 verschiedenen Aminosäuren aufgebaut sind.

SANGER et al. gelang 1953 erstmals die Aufklärung der Aminosäuresequenz eines Polypeptids, der des blutzuckerregulierenden Hormons Insulin, das aus 51 Aminosäuren besteht^[3,4]. Mit Hilfe einer von EDMAN entwickelten effizienteren Sequenzierungstechnik gelang BRAUNITZER 1961 die Sequenzierung des menschlichen Hämoglobins und damit die erste Entschlüsselung der Aminosäureabfolge in einem Protein.

Hunderte von Proteinen sind durch den EDMAN-Abbau von Peptiden, die durch spezifische Spaltung gewonnen wurden, sequenziert worden. Auch heute erfolgt die Bestimmung der Aminosäuresequenz dieser Stoffgruppe praktisch ausschließlich mit dem EDMAN-Abbau, wobei die Empfindlichkeit der Methode seit ihrer Einführung um den Faktor 10^3 gesteigert werden konnte.

WATSON und CRICK klärten 1953 die Doppelhelix-Struktur der DNA auf^[5]. Diese Entdeckung führte unmittelbar zum Verständnis der DNA-Replikation. Die Aminosäuresequenz eines Proteins wird durch eine Nukleotidsequenz in der DNA codiert, d.h. eine Nukleotidsequenz trägt eine Information, die die Bildung einer Aminosäuresequenz determiniert.

Die Information für den Bau der Proteine wird in der DNA durch nur vier verschiedene Basen (Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin) codiert, wobei jeweils ein Triplet aus drei Basen die Information für eine Aminosäure enthält. Insgesamt ergeben sich $4^3 = 64$ verschiedene Basentriplets, die für 20 Aminosäuren codieren. Da mehrere Codons für eine einzelne Aminosäure codieren, d.h. der Code degeneriert ist, kann aus einer Aminosäuresequenz nicht auf den exakten Basencode geschlossen werden.

Für die meisten Aminosäuren variiert nur die dritte Base des Tripletts, so daß von der Aminosäure ausgehend, die ersten beiden Basen definiert sind^[6,7].

In den letzten zwei Jahrzehnten sind eine Reihe effizienter Methoden zur Sequenzierung von Genen und vollständigen Genomen entwickelt worden, so daß das Sequenzieren ganzer Gene schneller und mit deutlich geringerem Aufwand zu bewerkstelligen ist als das Sequenzieren der zugehörigen Proteine^[8,9]. Daher verzichtet man meist auf das Sequenzieren durch EDMAN-Abbau und bestimmt die Aminosäuresequenz der Proteine indirekt aus der Nukleotidsequenz der entsprechenden Gene bzw. m-RNA.

Insbesondere auch durch dieses Verfahren konnten bis März 1998 mehr als 70000 Primärstrukturen bestimmt werden, die aus Datenbanken abgerufen werden können. Im Rahmen des Projekts *SwissProt* in der Schweiz werden die Sequenzen der Proteinprimärstrukturen gesammelt^[10].

Beachtet werden muß jedoch in diesem Zusammenhang, daß für dieses indirekte Verfahren der Aminosäuresequenzbestimmung zumindest ein kleiner Ausschnitt aus der Aminosäuresequenz benötigt wird, um die zugehörige codierende DNA abzuleiten. Um solche Teilsequenzen eines Proteins zu erhalten, ist eine ausreichende Menge dieses Proteins als Reinsubstanz nötig.

Der Erhalt des Reinproteins ist umso leichter, je größer sein Anteil an der Gesamtproteinmenge der zu untersuchenden Zelle ist. Das ist einer der Gründe, warum bis heute die meisten sequenzierten Enzyme Enzyme des Primärstoffwechsels sind, da sie im allgemeinen in viel stärkerem Maße durch den Organismus exprimiert werden als die des Sekundärstoffwechsels.

Ein anderer Grund für das Ungleichgewicht in der Sequenzierung von Enzymen des Primärstoffwechsels zu denen des Sekundärstoffwechsels ist, daß Pflanzen, Tiere, der Mensch sowie prokaryotische Mikroorganismen in ihrem Primärstoffwechsel große Übereinstimmung zeigen. Diese Einheit lebender Materie zeigt sich schon darin, daß der genetische Code für alle Mikroorganismen derselbe ist, d.h. die Zuordnung der jeweiligen Nukleotid-tripletts zu bestimmten Aminosäuren ist gleich.

Weiterhin synthetisieren und speichern sie ähnliche Stoffe, wobei sie auch ähnliche bzw. gleiche Biosynthesewege benutzen. Die Stoffwechselreaktionen katalysierenden Proteine ähnlicher Funktion zeigen bei allen Organismen auch ähnliche dreidimensionale Struktur sowie eine ähnliche Aminosäuresequenz. Wenn also ein Enzym aus einer Spezies bekannt ist, kann relativ problemlos aus dem Vergleich der Gesamt-m-RNA das entsprechende Gen und damit auch die Aminosäuresequenz für diese Spezies ermittelt werden^[11].

Der Primärstoffwechsel (Glykolyse, Citratzyklus, Aminosäuresynthese, Kohlenhydratsynthese, Lipidsynthese und Nukleotidsynthese) wird also durch einen Satz von Enzymen gesteuert, der sich in den einzelnen Zellen verschiedener Organismengruppen nur wenig voneinander unterscheidet.

Im Gegensatz zum Primärstoffwechsel werden beim Sekundärstoffwechsel nicht die Gemeinsamkeiten, sondern die Unterschiede im Stoffwechsel der verschiedenen Organismengruppen vergleichend gegenüber gestellt. Sekundäre Naturstoffe sind nicht allgemein verbreitet, sondern kommen nur in einigen Organismengruppen vor. Dabei ist die Palette an Naturstoffen von Spezies zu Spezies verschieden.^[12]

Dennoch sind auch an den Biosynthesewegen von sekundären Naturstoffen ähnlich viele Enzyme beteiligt wie an Wegen des Primärstoffwechsels. Daraus ergibt sich, daß mit einer viel größeren Zahl von grundsätzlich verschiedenen Enzymen des Sekundärstoffwechsels als denen des Primärstoffwechsels ausgegangen werden muß. Dies hat zur Folge, daß generell jeder einzelne Sekundärstoffwechselweg für jede Art extra aufgeklärt werden muß.

2 Erforschung von Biosynthesewegen

Bereits 1891 unterschied der Pflanzenphysiologe KOSSEL die Naturstoffe in Primär- und Sekundärmetaboliten^[13]. Während der Primärstoffwechsel mit vergleichsweise wenigen, oft niedermolekularen Verbindungen auskommt, sind bereits mehr als 80000 Sekundärstoffe bekannt^[14].

Neben der biologischen Wirkung eines Naturstoffs ist die Frage sowohl der Biogenese, d.h. der Herkunft aller im Naturstoff vorkommenden Atome, als auch der Biosynthese, des Wissens über die Verknüpfungsschritte der Grundbausteine und der zugrundeliegenden Synthesemechanismen, von Interesse. Dabei können neben enzymatisch katalysierten Reaktionen vereinzelt auch spontane, nicht-enzymatische Reaktionen vorkommen.

Das Aufdecken von Biosynthesewegen führt vor allem für die Grundlagenforschung zu neuen Erkenntnissen, wie z.B. zur Klassifizierung von Naturstoffen oder zu Ideen für chemische Synthesen. Auch die an der Biosynthese beteiligten Enzyme sind von Interesse, könnten sie doch zur *in vitro*- oder *in vivo*-Synthese bekannter oder neuartiger Verbindungen dienen. Desweiteren kann eine Modifizierung der Biosynthese zur Steigerung der Produktion pharmazeutisch interessanter Metaboliten, durch strukturelle Variation^[13,15,16] oder auch durch Unterbrechung, z.B. bei der Produktion toxischer Metabolite^[17], angestrebt werden (siehe Abbildung 1).

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurden erste Hypothesen zur Biosynthese von Naturstoffen aufgestellt^[13].

Da zu diesem Zeitpunkt die Entstehung eines Naturstoffes nur auf indirekte Weise untersucht werden konnte^[18], indem Naturstoffe verwandter Konstitution miteinander verglichen wurden und aufgrund von Strukturanalogien auf ähnliche biogenetische Grundbausteine geschlossen wurde, konnten zunächst nur Aussagen zur Biogenese gemacht werden.

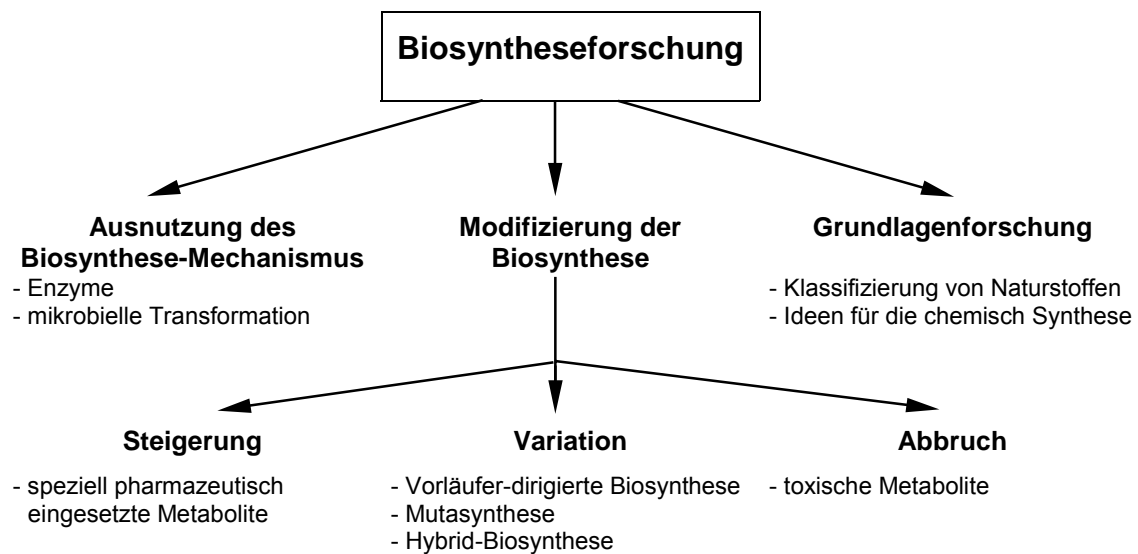


Abbildung 1: Anwendungen der Biosyntheseforschung

Studien zur Biosynthese erfolgten zu dieser Zeit mit Hilfe von der Zelle nachempfundenen Reaktionen. Dabei ging man davon aus, daß die hypothetischen Reaktionsteilnehmer unter physiologischen Bedingungen, d.h. nahezu neutraler pH-Wert, große Verdünnung der Reaktionsteilnehmer und verhältnismäßig niedrige Temperatur, zum entsprechenden Naturstoff reagieren. Diese sogenannten biomimetischen Synthesen konnten jedoch nur ablaufen, wenn es sich um eine nicht-enzymatische Reaktion handelte. Auch war man sich darüber im Klaren, daß die jeweilige Synthese in der Zelle nicht unbedingt so verlaufen muß wie unter „physiologischen Laborbedingungen“.

Seit der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts wird vor allem das Verfahren der Fütterung isotonenmarkierter Verbindungen zur Untersuchung der Biogenese von Naturstoffen eingesetzt.

Dabei werden vermutete biosynthetische Vorläufer durch radioaktive (z.B. ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S) oder stabile Isotope (z.B. ^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{17}O , ^{18}O) markiert und an den jeweiligen Produzenten verfüttert^[19,20]. Die Bestimmung des genauen Einbauortes in den Naturstoff ist beim Einsatz von radioaktiv markierten Vorläufern nur durch komplexe Abbaureaktionen möglich. Der Einbau stabil-

isotopenmarkierter Vorläufer in das Zielmolekül kann NMR-spektroskopisch analysiert werden.

Die Analyse des Metabolitenmusters sowie die Aufnahme von Produktionskurven ermöglichen einen ersten Einblick in einen Biosyntheseablauf.

Durch die Methode der Cosynthese, die auf der Zufütterung von Biosynthese-Intermediaten an Blockmutanten, d.h. Produzentenstämmen, die in bestimmten Schritten ihrer Biosynthese gehemmt sind, beruht, lassen sich Biosynthesesequenzen ermitteln^[21].

Großes Interesse besteht aber in der Aufklärung der an der Biosynthese beteiligten Enzyme^[22]. Erst die Kenntnis der Reaktionen, die durch diese Enzyme katalysiert werden, erlaubt eine genaue Untersuchung einzelner Biosyntheseschritte.

Das Methodenspektrum der Biosyntheseforschung wird durch die Molekularbiologie wesentlich erweitert. Sie wird unter anderem zur Sequenzierung der Gene von Biosyntheseenzymen eingesetzt und ermöglicht das Erkennen evolutionärer Zusammenhänge.

Beispiele für bisher sehr detailliert untersuchte Biosynthesewege sind die der Flavonoide^[23], der Isoflavonoide^[24], der Lignin-Vorstufen^[25] und der Herzglykoside vom Digitalis-Typ^[26]. Fast lückenlos aufgeklärt ist aus der Gruppe der Alkaloide die Biosynthese verschiedener Benzophenanthridine^[27,28], Benzylisochinoline^[29,30], aber auch der Indolalkaloide vom Heteroyohimban^[31], sowie Ajmalan- und Sarpagan-Typ^[32]. Auch einige an der Biosynthese von Chinolizidin^[33] und Pyrrolizidin-Alkaloiden^[34] beteiligte Enzyme sind weitgehend charakterisiert.

3 *Rauvolfia serpentina* – Historie einer alten Medizinalpflanze

Im Jahre 1703 fügte der französische Botaniker CHARLES PLUMIER in seinem erschienenen Buch „Nova plantarum americanarum genera“ der Pflanzenfamilie Apocynaceae die Gattung *Rauvolfia* zu^[35]. Mit diesem Gattungsnamen würdigte er den mittelalterlichen Arzt und Naturforscher LEONHARD RAUWOLF. Die Gattung *Rauvolfia* wurde 1895 von SCHUMANN in die Unterfamilie Plumerioideae eingeordnet^[36]. Sie umfaßt etwa 150 Arten^[37] und ist in nahezu allen tropischen Gebieten der Erde beheimatet. *Rauvolfia serpentina*, ein bis zu 1 m hoher Strauch, wächst in den Savannen und Wäldern Südostasiens bis zu einer Höhe von 1500 m.

Bereits in der vorvedischen Zeit, vor etwa 3000 Jahren, wurde *Rauvolfia serpentina*, damals als Sarpagandha (Sanskrit), Chandra oder Chot Chand bekannt, als Arzneipflanze zur Behandlung von Schlangenbissen und Insektenstichen genutzt^[38]. In der darauf folgenden Ayurvedischen Periode wurde die Wurzeldroge Sarpagandha gegen eine Vielzahl von Krankheiten, wie verschiedene Infektionskrankheiten, Magenverstimmung, Durchfall und Fieber, sowie zur Linderung von Epilepsie und Geisteskrankheiten eingesetzt. Die Versorgung der ayurvedischen Ärzte erfolgte durch berufsmäßige Pflanzensammler. Gleichzeitig wurde die Pflanze auch bereits in Kräutergärten kultiviert, die an die ayurvedischen Krankenhäuser angeschlossen waren^[39].

Die Kunde von den vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Droge verbreitete sich im Mittelalter über den arabischen Raum und gelangte schließlich auch infolge wiederholter Berichte über diese Länder nach Europa. Dabei lag der Schwerpunkt des Interesses an dieser Arzneipflanze vor allem auf den vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der Aufgüsse und Tees auf Grund der diuretischen, abführenden, anthelmintischen, antitussiven und sedativen Wirkung^[40,41].

Erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts wurde damit begonnen, das breite Wissen über das Wirkungsspektrum von *Rauvolfia serpentina* auf eine pharmakologische und phytochemische Grundlage zu stellen.

KIRTIKAR und BASU berichteten 1919 erstmals über die blutdrucksenkende Wirkung der Gesamtdroge^[42]. Gleichzeitig wurden Untersuchungen über die Wirkung auf das zentrale Nervensystem durchgeführt. Von GRUPTA und DEBT wurden schon 1943 Extrakte aus *Rauvolfia* zur Therapie von Epilepsie eingesetzt^[43].

Die phytochemische Untersuchung von Extrakten zeigte, daß das wirksame Prinzip in der Alkaloidfraktion lokalisiert ist. Den indischen Wissenschaftlern SIDDIQUI und SIDDIQUI gelang es 1931 die ersten sechs Alkaloide zu isolieren, unter ihnen auch Ajmalin, benannt nach dem Gründer des Tibbi College in Dehli, Hakim Ajmal Khan.^[44] Die Isolierung und Charakterisierung des pharmazeutisch interessanten Alkaloids Reserpin aus Rauwolfiawurzel gelang MÜLLER et al. 1952^[45]. Reserpin besitzt als antisymphatotonisch, antihypertonisch und sedativ wirksames Alkaloid medizinische Bedeutung in der Hypertonie-Therapie, sowie als Neuroleptikum.

Ajmalin ist ein Antiarrhythmikum vom Na-Kanal-blockierendem Typ (Klasse IA – Chinidin-Typ) und wird angewandt, wenn Rhythmusstörungen so ausgeprägt sind, daß die Pumpfunktion des Herzens leidet^[46]. In die klinische Therapie wurde es 1959 von KLEINSORGE eingeführt^[47].

Bis heute konnten über 50 verschiedene Alkaloide in *Rauvolfia serpentina* identifiziert werden.

Nachdem die in der Wurzelrinde lokalisierten Hauptalkaloide Reserpin, Rescinnamin, Raubasin, Ajmalin und Serpentin identifiziert waren, trat die Strukturaufklärung dieser Verbindungen in den Vordergrund des Interesses.

Die Aufklärung der Struktur des Ajmalins erwies sich aufgrund des komplizierten Ringsystems als äußerst schwierig. Ajmalin ist ein monoterpenoides Indolalkaloid, das aus einem hexacyclischen Ringsystem mit neun chiralen C-Atomen aufgebaut ist (siehe Abbildung 2).

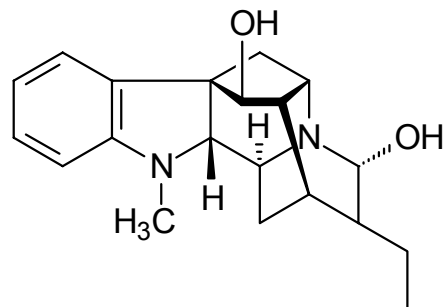


Abbildung 2: Strukturformel von Ajmalin

Erste Versuche zur Strukturaufklärung des Ajmalins unternahm ROBINSON, der 1949 wichtige Strukturelemente aufzeigen konnte^[48]. Nachdem WOODWARD 1956 ein hexacyclisches Grundgerüst vorgeschlagen hatte^[49], vervollständigten BARTLETT et al. 1961 die Strukturaufklärung, indem sie die Stereochemie von Ajmalin ermittelten^[50].

4 Biosynthese von Ajmalin

Mit der Strukturaufklärung des Ajmalins wurden auch Hypothesen zur Biosynthese entwickelt. Die ersten Hypothesen, aufgestellt von ROBINSON 1956^[51] sowie WENKERT und BRINGI 1959^[52], konnten durch Fütterungsexperimente an *Rauwolfia serpentina* und *Rauwolfia verticillata* widerlegt werden, die BARTON et al. 1965^[53] durchführten. BARTON et al. konnten jedoch die Ergebnisse von LEETE^[54] bestätigen, der bei seinen *in vivo*-Experimenten 1960 mit Rauwolfiapflanzen den Einbau von Tryptophan in Ajmalin, Reserpin und Serpentin beobachtete. Damit konnte erstmals die Rolle der Aminosäure Tryptophan als Präkursor für den Indolteil von Ajmalin bewiesen werden.

Auch der Einbau von Methionin, Loganin und Strictosidin in Ajmalin wurde durch Fütterungsexperimente an Rauwolfiapflanzen nachgewiesen^[55,56]. Somit stand fest, daß der restliche C9-Körper in Übereinstimmung mit der Hypothese von THOMAS^[57] sowie WENKERT und BRINGI^[52] aus dem Terpenoid-Stoffwechsel und die *N*-Methylgruppe aus Methionin stammt.

Eine genauere Untersuchung der Ajmalinbiosynthese wurde erst durch die Bereitstellung von genügend, biosynthetisch aktivem Zellmaterial mit Hilfe der Zellkulturtechnik ermöglicht.

Rauwolfia serpentina ist als tropische Pflanze unter Gewächshausbedingungen nur sehr schwer kultivierbar. Insbesondere aus diesem Grund wurden Kallus- und Zellkultursysteme von *Rauwolfia serpentina* angelegt. Diese *in vitro*-Systeme ermöglichen die Produktion von Zellen im kg-Maßstab und ermöglichen so die Untersuchung der Biosynthese mit Hilfe klassischer Tracer-Experimente oder durch zellfreie Untersuchungen (siehe I.2).

Bei der Verwendung von Zellkulturen wird genutzt, daß jede Zelle der Zellkultur Träger der gesamten Erbinformation zur Biosynthese der Sekundärprodukte ist.

Dennoch ist zu beachten, daß in Zellkulturen manche Gene reprimiert bleiben können. So ist mit dem Verlust der morphologischen Differenzierung nicht selten der Verlust der Spezialisierung korreliert. Die vollständige Aufklärung eines kompletten Biosyntheseweges gelingt somit nur, wenn der Sekundärstoff wie in der Ganzpflanze auch in der Zellkultur gebildet wird.

Erste Experimente mit langsam wachsenden Kalluskulturen (Wachstumsperiode 55 d) zeigten, daß diese in der Lage sind, einige typische Rauwolfiaalkaloide wie Ajmalin, Ajmalicin und Serpentin zu synthetisieren. Jedoch konnten mit diesen Kalluskulturen nur sehr geringe Alkaloidmengen produziert werden^[58,59,60].

In den 70er Jahren konnte von ZENK eine Zellkultur von *Rauvolfia serpentina* etabliert werden, die unter Laborbedingungen in Standardnährlösungen wächst und ohne großen Aufwand ausreichend Pflanzenzellmaterial für die Untersuchungen liefern kann^[58,59,60].

Bei den auch im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellsuspensionskulturen von *Rauvolfia serpentina* (siehe II.3) handelt es sich um entdifferenzierte Zellen der o.g. Kultur, die noch eine vollständige Indolalkaloidsynthese zeigen und damit für die Untersuchung der Ajmalin-Biosynthese geeignet sind.

Die zunächst durchgeführte phytochemische Untersuchung der Zellsuspensionskultur von *Rauvolfia serpentina* führte zur Isolierung von 12 Hauptalkaloiden, von denen fünf dem Ajmalin-Typ zugeordnet werden konnten^[61].

Die Zellkulturen liefern das in der Pflanze nur als Spurenalkaloid vorkommende Raucaffricin in einer Menge bis zu 1.6 g/l^[62], dagegen das eigentliche Hauptalkaloid Ajmalin und seine Acetylierungsprodukte nur bis max. 0.3 g/l, was etwa dem natürlichen Vorkommen bezogen auf das Trockengewicht entspricht^[63].

Das nächste Ziel bei der Aufklärung des Biosyntheseweges von Ajmalin war es, Enzymaktivitäten *in vitro* zu finden und diese Enzyme zu charakterisieren. Aus Organen ausdifferenzierter Pflanzen lassen sich Enzyme nur schwierig gewinnen, da sie beim Extrahieren durch Tannine und Phenole weitgehend inaktiviert werden. Auch aus diesem Grund dienen anstelle von Pflanzen pflanzliche Zellkulturen als Enzymquelle.

Durch Isolierung und teilweise Charakterisierung der beteiligten Enzyme gelang es vor etwa 15 Jahren den Biosyntheseweg zwischen Strictosidin und Ajmalin festzulegen^[64,65,66,67]. Dieser wurde in den folgenden Jahren zwischen Vinorin und Ajmalin wesentlich erweitert^[68,69,70].

In den letzten Jahren konnte der Biosyntheseweg des Ajmalins nahezu vollständig aufgeklärt werden.

Bisher sind uns 15 Enzyme bekannt, die an der Biosynthese der Indolalkaloide vom Ajmalan- und Sarpagan-Typ beteiligt sind. In Abbildung 3 ist der aufgedeckte Hauptweg der Biosynthese von Ajmalin in *Rauvolfia serpentina* ausgehend von Tryptamin und Secologanin dargestellt. Die Zahlen an den Reaktionspfeilen markieren die an der Ajmalinbiosynthese beteiligten Enzyme, die in Tabelle 1 zusammengefaßt dargestellt sind.

Die beteiligten Enzyme können aufgrund der unterschiedlichen Art an katalysierten Reaktionen einer Reihe verschiedener Enzymklassen zugeordnet werden und zeichnen sich darüber hinaus durch eine hohe Substratspezifität aus.

Im Jahre 1988 gelangen erstmals für ein Enzym der Alkaloidbiosynthese, für die Strictosidin-Synthase aus *Rauvolfia serpentina*, die Schritte Enzymisolierung, Sequenzierung und anschließende heterologe Expression in *Escherichia coli*^[71,72].

Neben der Expression in Bakterien gelang wenig später auch eine Expression des aktiven Enzyms in Hefen und Insektenzellkulturen^[73].

Die Expression der Strictosidin-Synthase in Mikroorganismen und Eukaryoten-Zellkulturen ermöglicht es das Enzym in so großer Menge bereitzustellen, daß es physikalisch und biochemisch charakterisiert werden kann und auch für eine biotechnologische Anwendung zur Verfügung steht^[74].

Die Strictosidin-Synthase kondensiert in der ersten Reaktion der Ajmalinbiosynthese die biogenetischen Vorstufen Tryptamin und Secologanin zum Glucoalkaloid Strictosidin. Dieses Glucoalkaloid ist der Vorläufer aller monoterpenoiden Indolalkaloide. Strictosidin und das Enzym Strictosidin-Synthase nehmen damit eine Schlüsselposition in der Biosynthese dieser Naturstoffgruppe ein^[75].

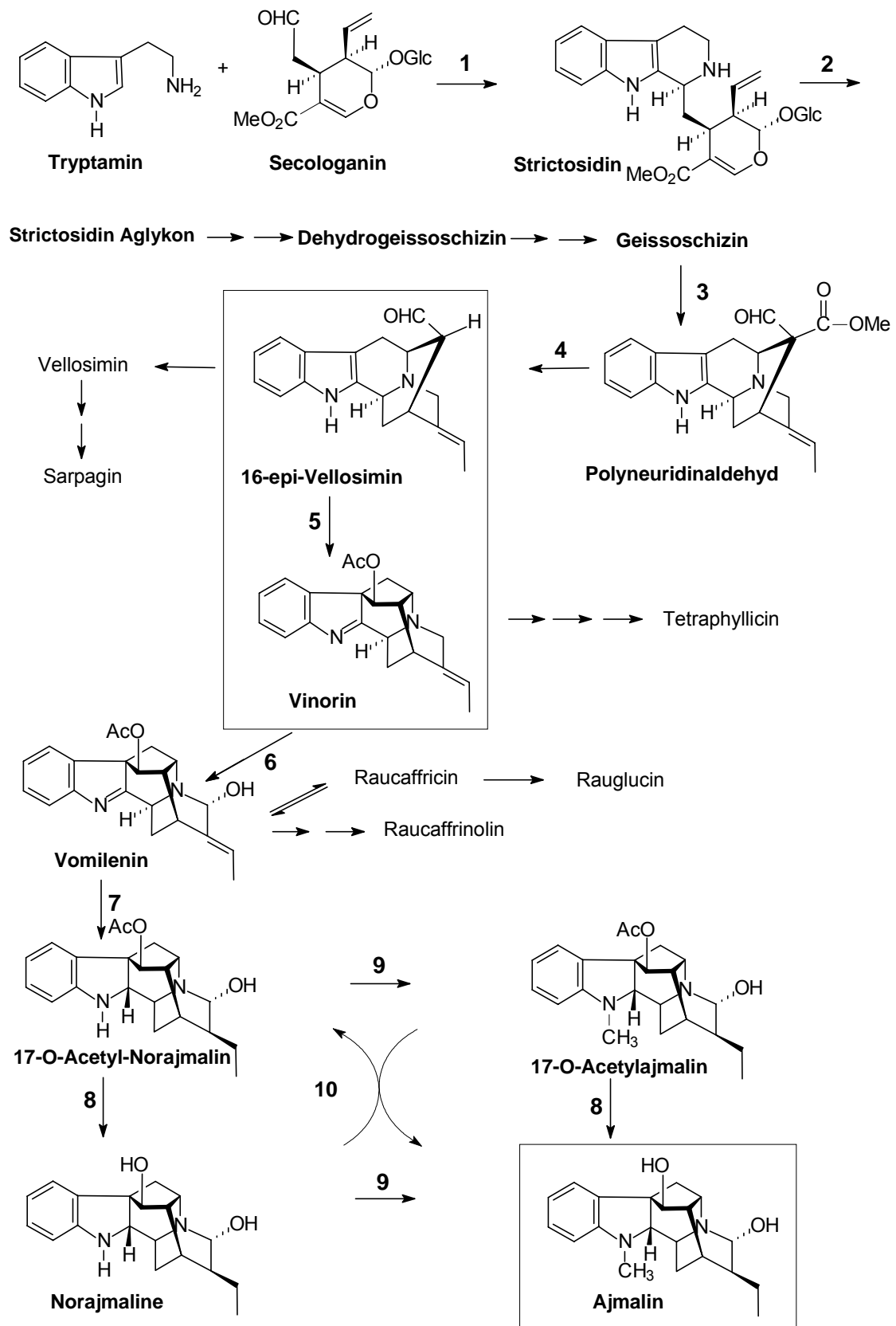
Abbildung 3: Enzymatische Biosynthese von Ajmalin in *Rauvolfia serpentina*

Tabelle 1: Enzyme der Ajmalinbiosynthese in *Rauvolfia serpentina*

Nr.*	Enzym	Enzymklasse/ EC-Nummer	Cofaktor	Art der katalysierten Reaktion
1	Strictosidin-Synthase	Synthase/ 4.3.3.2	-	Bildung einer C-C- und C-N- Bindung
2	Strictosidin- Glucosidase (I + II)	Hydrolasen/ 3.2.1.-	-	Abspaltung von Glucose
3	Sarpagan- Brückenzym	Oxidoreduktase/ 1.6.2.-	NADPH ₂ /O ₂	Bildung einer intramolekularen C-C-Bindung
4	Polyneuridinaldehyd- Esterase	Hydrolase/ 3.1.1.-	-	Hydrolyse eines Methylesters
5	Vinorin-Synthase	Synthase/ 4.1.2.-	Acetyl-CoA	Bildung einer C-C-Bindung
6	Vinorin-Hydroxylase	Oxidoreduktase/ 1.6.2.-	NADPH ₂ /O ₂	Einführung einer OH-Gruppe
7	Vomilenin- Reduktase(n)	Oxidoreduktase(n)/ 1.3.1-/1.5.1.-	NADPH ₂	Hydrierung von C-C- und C-N- Doppelbindungen
8	17-O-Acetyl-Ajmalan- Esterase	Hydrolase/ 3.1.1.-	-	Abspaltung eines Acetylrestes
9	Norajmalin-N _α - Methyltransferase	Transferase/ 2.1.1.-	S-Adenosyl- methionin	N-Methylierung
10	17-O-Acetyl-Ajmalan- Acetyltransferase	Transferase/ 2.3.1.-	Acetyliertes Alkaloid	Acetylierung einer OH-Gruppe

* Die in Spalte 1 angegebenen Nummern kennzeichnen die Lokalisation des Enzyms im Biosyntheschema der Abbildung 3.

In den letzten Jahren gelang weiterhin die Sequenzierung und heterologe Expression für folgende an der Biosynthese der Ajmalan- und Sarpagan-Alkaloide beteiligten Enzyme:

- 1995 Raucaffricin-Glucosidase^[76,77]

Enzymklasse: Hydrolase

Art der katalysierten Reaktion: Spaltung einer glycosidischen Bindung
(Raucaffricin \longrightarrow Vomilenin)

- 1999 PNA-Esterase^[78]

Enzymklasse: Hydrolase

Art der katalysierten Reaktion: Hydrolyse eines Methylesters
(Polyneuridinaldehyd \longrightarrow 16-epi-Vellosimin)

5 Ziel der Arbeit

An der Biosynthese des Ajmalins ausgehend von Tryptamin und Secologanin sind mindestens 10 hoch substratspezifische Enzyme beteiligt, die bisher weitgehend charakterisiert, von denen aber nur drei bisher zur Homogenität gereinigt werden konnten. Das Vorliegen einer ausreichenden Menge gereinigten Proteins ist aber Voraussetzung für eine genaue Untersuchung der durch ein Enzym katalysierten Reaktion.

Außerdem ist der Erhalt des reinen Proteins Bedingung für die Aufklärung seiner Aminosäuresequenz, mit deren Hilfe sich auch das codierende Gen identifizieren läßt. Ist schließlich die Nucleotidsequenz ermittelt, ist es möglich das Enzym heterolog zu exprimieren und so in größerer Menge für die Charakterisierung bereitzustellen.

Sind alle Gene der an einer Biosynthese beteiligten Enzyme bekannt, so besteht die Möglichkeit durch Inhibierung oder Überexpression einzelner Gene diesen Stoffwechselweg so zu regulieren, daß z.B. pharmazeutisch relevante Stoffe in dem veränderten Organismus vermehrt gebildet werden.

Die Vinorin-Synthase ist ein an der Biosynthese des Ajmalins beteiligtes Enzym, das in einer anspruchsvollen Reaktion die Bildung von Vinorin aus 16-epi-Vellosimin und damit, unter Übertragung einer Acetylgruppe, den letzten Ringschluß des Ajmalan-Gerüsts katalysiert (siehe Abbildung 3).

Ziel dieser Arbeit ist es aus den oben genannten Gründen durch Entwicklung eines Reinigungsschemas eine ausreichende Menge Vinorin-Synthase für die Aufklärung der Aminosäuresequenz zur Verfügung zu stellen. Vorbedingung für eine erfolgreiche Anreicherung des Proteins war zunächst die Etablierung eines Tests mit dem qualitative und quantitative Aussagen über die Enzymaktivität gemacht werden können.

II MATERIAL

Auf eine besondere Kennzeichnung von warenrechtlich oder urheberrechtlich geschützten Namen wird im folgenden verzichtet.

1 Pflanzliche Zellkulturen

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Proteinreinigungen wurden Zellsuspensionskulturen verschiedener Zelllinien („T30“, „T30 München“, „*Rauvolfia serpentina* München“) von *Rauvolfia serpentina* sowie eine Hybridkultur aus *Rhazya stricta* und *Rauvolfia serpentina* verwendet. Die eingesetzten Zellkulturen entstammen der Sammlung des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Die Kultivierung der Zellkulturen erfolgte in mit Schaumgummistopfen steril verschlossenen 1-l-Erlenmeyerkolben, bei einer Umgebungstemperatur von 25 ± 2 °C und diffusem Dauerlicht (ca. 600 Lux). Die Durchmischung der Zellen wurde durch kontinuierliches Schütteln (100 rpm) der Erlenmeyerkolben auf Rotationsschüttlern gewährleistet.

Zur Subkultivierung wurden wöchentlich ca. 200 ml Zellsuspension unter sterilen Bedingungen in 250 ml frisches LS-Medium (siehe II.2) überimpft.

Für die Proteinreinigung wurden die Zellen nach 7 Tagen durch Vakuumfiltration mit einem Büchnertrichter über einen Papierfilter vom Nährmedium abgetrennt und mit flüssigem Stickstoff eingefroren.

Das so erhaltene tiefgefrorene Zellkulturgewebe wurde bis zu seiner Verwendung bei -18 °C gelagert.

2 Kulturmedium

Das für die Kultivierung der Zellsuspensionskulturen verwendete LS-Medium wurde gemäß LINSMAIER und SKOOG^[79] unter Zusatz von 1×10^{-6} mol/l 1-Naphthylessigsäure und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure hergestellt und mit 1 M Natronlauge auf pH 5.7 eingestellt.

Die Sterilisation erfolgte 30 min unter gespanntem Wasserdampf bei 123 °C.

3 Fertigsäulen/Säulenmaterialien/Leersäulen

Hersteller/Lieferant	Produkte
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	Fertigsäulen: Mono P HR 5/20, Mono Q HR 5/5, RESOURCE HIC Test Kit, RESOURCE S, Superdex 75 HR 10/30 Säulenmaterialien: SOURCE 15Phe, SOURCE 30Q Leersäulen: XK 16/20, XK 50/20
BioRad (Krefeld)	Säulenmaterial: Macro-PrepCeramic Hydroxyapatite Type I, 40 µm
Merck (Darmstadt)	HPLC-Säule: LiChrocart 250-4, LiChrospher 60 RP- select B (5µm)
Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	Coenzym-A-Agarose

4 Spezielle Chemikalien und Zubehör

Hersteller/Lieferant	Produkte
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	Clean Gel 25 S-Fertiggele, LMW Electrophoresis Calibration Kit, Polybuffer 74

Hersteller/Lieferant	Produkte
Amicon (Witten)	Microcon-10 Einwegkonzentratoren
AppliChem (Darmstadt)	Acrylamid, Bis-Tris, Glycin, TEMED, Tris
ICN (Eschwege)	SDS
Intermedica (Klein- Winternheim)	Einmal-Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße, Halbmikroküvetten
Merck (Darmstadt)	Acetyl-Coenzyme A Trilithiumsalz, Chloroform, DC- Platten, Dichlormethan, Methanol
Roth (Karlsruhe)	Acetonitril, Ammoniumperoxodisulfat
Schleicher & Schüll (Dossel)	Membranfilter 0.2 µm
Serva (Heidelberg)	Coomassie Brilliant Blue G 250 und R 250, Servapor Dialyseschläuche (Durchmesser 16 cm und 29 cm)

Die verwendeten Reinalkaloide stammen aus der Alkaloidsammlung des Arbeitskreises von Prof. Dr. J. Stöckigt, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz.

5 Geräte

Methoden	Geräte
Aufschluß von Gewebe	Ultraturrax TP 18/10 (IKA, Stauffen)
Dokumentation	Flachbettscanner Highscan (Highscreen)
Elektrophorese	Horizontalelektrophoresekammer LKB 2117 Multiphor II (Amersham Pharmacia, Freiburg)
	Vertikalelektrophoresekammer SE 600 Hoefer (Amersham Pharmacia, Freiburg)
	Netzgerät Power Pac 3000 (BioRad, München)

Methoden	Geräte
Elektrophorese (Fortsetzung)	Kryo-Thermostat 350 (Haake, Berlin)
Gefriertrocknung	Gefriertrocknungsanlage Alpha-6 (Christ, Osterode)
HPLC	Merck Hitachi-System (Darmstadt) bestehend aus: Pumpe L-6200 Autosampler AS-2000 UV/VIS-Detektor L-4250 Chromato-Integrator D-2500
pH-Messung	pH-Meter 761 Calmatic (Bacherhofer, Reutlingen)
Proteinreinigung	Äkta Explorer-System (Amersham Pharmacia, Freiburg) bestehend aus: 2 Pumpen P-900 2 Durchflußzellen (22 µl und 88 µl) zur Messung von pH, Temperatur, Leitfähigkeit) Multi-wavelength UV-VIS-Detektor UV-900 Mischkammer M-900 Pufferventil IV-908 Säulenselektionsventil PV-98 Fraktionskollektor Frac-900 Kühlung: Maxicold-Kühlschrank (Amersham Pharmacia, Freiburg) Computer: Pentium-133 MHz PC Compaq Software: UNICORN Control System
Seralwasser	Seralpur PRO 90 CN (Seral, Ransbach-Baumbach)

Methoden	Geräte
Sterilisation und steriles Arbeiten	Laminar-Flow-Box (Fröbel)
	NU 440-400 E (Zapf, Sarstedt)
	Autoklav TEC 120 (Federagi Autoclavi SPA, Albuzzano, Italien)
Schüttler	Pilot Shake RC 2 SR (Braun, Melsungen)
Temperieren	Thermomixer 5437 (Eppendorf, Hamburg)
Zentrifugation	Kühlzentrifuge Avanti J-25 mit Rotor JA 10 (Beckman, München)
	Kühlzentrifuge Sorvall RC 28 S mit Rotor GS-3 (DuPont, Bad Homburg)
	Kühlzentrifuge Z 320 K mit Rotor für 2 ml Reaktionsgefäße (Hermle, Gosheim)
	Tischzentrifuge Biofuge 15 mit Rotor für 2 ml Reaktionsgefäße (Hereaus, Osterode)

III METHODEN

1 Proteinreinigung

Sämtliche Arbeitsschritte der Proteinreinigung wurden bei 4 °C durchgeführt. Die Pufferlösungen wurden mit entsalztem Wasser hergestellt. Alle verwendeten Puffer wurden vor ihrem Einsatz steril filtriert.

In Abhängigkeit von der Zielstellung der jeweiligen Reinigung wurden zwischen 1 und 10 kg mit flüssigem Stickstoff eingefrorenes und bei –18 °C gelagertes Pflanzenzellkulturgewebe (siehe II.1) für die Enzymisolierung und Reinigung eingesetzt.

1.1 Präparation von Enzymrohextrakten

Zur Herstellung des Proteinrohextraktes wurde das Zellkulturgewebe zunächst mit der gleichen Menge (m/V) Aufschlußpuffer (100 mM Tris/HCl, pH 7.8, 20 mM MSH) versetzt und unter ständigem Rühren im Wasserbad (35 °C) schonend aufgetaut. In der so erhaltenen eisfreien Mischung wurden ca. 2 min mit dem Ultra-Turrax noch intakte Zellen aufgeschlossen und anschließend bei 10000 × g 20 min zentrifugiert.

Der erhaltene Überstand wurde mit (NH₄)₂SO₄ in den Konzentrationsbereichen 0-30 % (m/V) und 30-75 % (m/V) fraktioniert gefällt. Für die erste Fällung wurde bis zu einer Konzentration von 30 % (m/V) die entsprechende Menge (NH₄)₂SO₄ in kleinen Portionen über einen Zeitraum von 15 min zugegeben und die ausgefallenen Bestandteile durch Zentrifugation (10000 × g, 20 min) sedimentiert. Die im Überstand enthaltenen löslichen Proteine wurden durch Zugabe von (NH₄)₂SO₄ bis zu einer Konzentration von 75 % (m/V) ebenfalls in kleinen Portionen über einen Zeitraum von 30 min gefällt und

durch Zentrifugation ($10000 \times g$, 40 min) pelletiert. Die so erhaltenen Sedimente wurden danach in wenig Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.8, 10 mM MSH) (50 – 300 ml, je nach Proteinmenge) resuspendiert und über Nacht gegen 10 l Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.8, 10 mM MSH) dialysiert (siehe III.1.2.1).

Um nicht gelöste Bestandteile des Dialysats abzutrennen, wurde vor den anschließenden säulenchromatographischen Reinigungsschritten der so erhaltene Proteinrohextrakt erneut zentrifugiert ($10000 \times g$, 20 min).

1.2 Konzentrieren, Entsalzen und Umpuffern von Enzymlösungen

Um eine Proteinlösung für den nächsten Reinigungsschritt zu konditionieren, ist es oftmals notwendig, die Lösung zu konzentrieren bzw. zu ent- oder umzusalzen. Teilweise ist es möglich, die Konzentrierung und Entsalzung/Umsalzung in einem Schritt auszuführen.

1.2.1 Dialyse

Die Dialyse wurde vor allem zur Entsalzung von Proteinlösungen verwendet. Verwendet wurden Dialysemembran-Schläuche mit einer Molekulargewichtsausschlußgröße von 12 - 14 kD. Der Durchmesser der eingesetzten Dialyseschläuche, von 16 mm oder 29 mm, richtete sich nach dem Volumen der zu dialysierenden Lösung. Die Dialyse erfolgte gegen den entsprechenden Puffer unter Rühren über Nacht.

1.2.2 Konzentrieren von Proteinlösungen großer Volumina

Um Proteinlösungen mit einem Volumen über 2 ml zu konzentrieren, wurde das osmotisch wirksame PEG 20000 verwendet. Hierfür wurde unter gleichzeitiger Umpufferung in entsprechendem Puffer dialysiert, der zusätzlich 20 % PEG enthielt. Durchschnittlich wurde eine Konzentrierung um den Faktor 10 erreicht.

1.2.3 Konzentrieren von Proteinmengen kleiner Volumina

Sowohl das Konzentrieren als auch das Entsalzen von Proteinlösungen mit einem Volumen bis zu 2 ml erfolgte unter Verwendung von Microcon-10 Einwegkonzentratoren. Dabei konnten minimale Endvolumina von ca. 10 µl erreicht werden, wobei entgegen der Herstellerangabe die Konzentratoren mehrmals verwendet werden konnten.

Die eingesetzten Microcon-10 Konzentratoren besitzen eine Membran mit einer Ausschlußgröße von 10 kD, so daß größere Proteine durch Zentrifugation bei $10000 \times g$ über einen Zeitraum von 45 – 60 min von der Membran zurückgehalten werden. Das so erhaltene Konzentrat wird durch Zentrifugation der umgedrehten Zentrifugationseinheiten bei $1000 \times g$ (5 min) gewonnen.

1.3 Gehaltsbestimmung von Proteinlösungen

Die quantitative Gehaltsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte nach einer modifizierten Methode nach BRADFORD^[80]. Für die Bestimmung wurden 100 µl der jeweiligen Proteinlösung mit 900 µl Coomassie-Reagenz* versetzt, anschließend durchmischt und nach 5 min die Absorption bei 595 nm gemessen. Für die Kalibrierung wurden BSA-Lösungen definierter Konzentration verwendet.

Um die Größenordnung von Proteinkonzentrationen abzuschätzen, wurde vereinfacht angenommen, daß die UV-Absorption bei 280 nm, die mit dem Äkta-Explorer bei einer Chromatographie gemessen wurde, proportional zur Protein-Konzentration der Lösung ist.

Bei der SDS-Gelelektrophorese wurde die Proteinmenge einer Bande im SDS-Gel durch Vergleich der Farbintensität der Coomassie gefärbten Proteine mit der einer Bande eines Markerproteins (im allgemeinen BSA) bekannten Gehalts abgeschätzt.

1.4 Chromatographische Methoden

Sämtliche säulenchromatographischen Reinigungsschritte wurde mit Hilfe des Äkta-Explorer Systems durchgeführt.

* *Coomassie-Reagenz:*

50 mg Coomassie Brilliant Blue G-250 wurden in 50 ml Ethanol (96 %) gelöst und nach Zugabe von 100 ml Phosphorsäure (85 %) mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Das Reagenz konnte aufbewahrt bei 4 °C ohne Verlust an Meßgenauigkeit mehrere Monate verwendet werden.

1.4.1 Anionenaustauschchromatographie

Für die Anionenaustauschchromatographie wurden die Materialien SOURCE 30Q und Mono Q eingesetzt. Während das SOURCE 30Q-Material für den ersten Reinigungsschritt des Proteinrohextraktes verwendet wurde, diente das Mono-Q-Material vor allem wegen der Trennschärfe bei der Elution der Proteine der Feinreinigung von Proteinlösungen.

1.4.1.1 Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q

Bei dem für die Ionenaustauschchromatographie verwendeten Material SOURCE 30Q handelt es sich um einen starken Anionenaustauscher, dessen Gelmatrix aus porösen, monodispersen Polystyrol-Divinylbenzol-Kugeln mit einem Durchmesser von 30 μm besteht. Funktionelle Gruppe ist der quartäre Ammoniumrest Trimethylaminoethyl, der kovalent an die Polymerpartikel gebunden ist. Die einheitliche Größe der Partikel und die Abwesenheit von Partikelfragmenten in Verbindung mit der porösen Eigenschaft des SOURCE 30Q-Materials ermöglichen hohe Flußraten bei geringerem Druck im Vergleich zu anderen Materialien gleicher Partikelgröße.

Für die Trennung wurde eine XK 50/20-Säule, mit einem Innendurchmesser von 5 cm und einer Länge von 20 cm (entsprechend einem Säulenvolumen von ca. 270 ml), mit dem vorgequollenen und unter Vakuum entgasten Gelmaterial gefüllt.

Vor jeder chromatographischen Trennung wurde die Säule mit 2 Säulenvolumen Startpuffer äquilibriert. Die Proteinlösung wurde über die Systempumpe aufgetragen, nicht gebundene Proteine mit 0.5 Säulenvolumen Startpuffer entfernt und die gebundenen Proteine mit einem linear ansteigenden KCl-Gradienten auf 0.5 M über 6 Säulenvolumen eluiert.

Chromatographiebedingungen:

Säulenmaterial:	SOURCE 30Q
Säule:	XK 50/20
Proteinbindungskapazität:	25 mg Protein/ml Material
Säulenvolumen:	270 ml
Flußrate:	30 ml/min
Startpuffer:	10 mM Tris, pH 7.8, 10 mM MSH
Elutionspuffer:	1 M KCl, 10 mM Tris, pH 7.8, 10 mM MSH
Gradient:	linear 0 - 0.5 M KCl über 6 CV
Fraktionsgröße:	13 ml
Detektion:	UV 280 nm

1.4.1.2 Anionenaustauschchromatographie an Mono Q

Für die Austauschchromatographie an Mono Q kam eine HR 5/5-Fertigsäule zum Einsatz. Der starke MonoBeads-Anionenaustauscher basiert auf einem hydrophilen Polystyren-Divinylbenzol-Harz, das mit quartären Ammoniumresten (Trimethylaminoethyl) beladen ist. Die monodispersen Kugeln haben einen Durchmesser von 10 µm. Die Fertigsäule hat einen Innendurchmesser von 5 mm und eine Länge von 5 cm.

Vor jedem Lauf wurde die Säule mit 5 Säulenvolumen Startpuffer äquilibriert und anschließend die Proteinlösung mit der Systempumpe aufgetragen. Die Elution erfolgte nach Auswaschen nicht gebundener Proteine mit einem Säulenvolumen Startpuffer durch einen KCl-Gradienten auf 0.5 M KCl über 30 Säulenvolumen.

Chromatographiebedingungen:

Säulenmaterial:	Mono Q
Säule:	HR 5/5
Proteinbindungskapazität:	60 mg/ml Material
Säulenvolumen:	1 ml
Flußrate:	1 ml/min
Startpuffer:	10 mM Tris, pH 7.8, 10 mM MSH
Elutionspuffer:	1 M KCl, 10 mM Tris, pH 7.8, 10 mM MSH
Gradient:	linear 0 - 0.5 M KCl über 30 CV
Fraktionsgröße:	1 ml
Detektion:	UV 280 nm

1.4.2 Hydrophobe Interaktionen Chromatographie (HIC) an SOURCE 15PHE

Für die Hydrophobe Interaktionen Chromatographie konnte das Material SOURCE 15PHE genutzt werden. Dieses Material besteht aus der gleichen Matrix wie das für die Anionenaustauschchromatographie verwendete SOURCE 30Q-Material, d.h. die unter III.1.4.1.1 beschriebenen Eigenschaften wie bspw. die guten Flußeigenschaften treffen auch auf dieses Material zu. Nur trägt die Matrix einen hydrophoben Liganden (Phenylreste) und die Partikel haben einen Durchmesser von 15 µm.

Für die mit dem Material SOURCE 15PHE durchgeführten Reinigungsschritte wurde eine XK 16/20-Säule, mit einem Innendurchmesser von 1.6 cm und einer Länge von 20 cm, mit dem vorgequollenen, entgasten Material bis zu einer Betthöhe von 14.5 cm gepackt.

Vor jedem Proteinauftrag wurde die Säule mit zwei Säulenvolumen Startpuffer äquilibriert. Der Proteinlösung wurde dann $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ zugegeben, so daß sie eine Konzentration von 1 mol/l aufwies und anschließend über die Systempumpe aufgetragen. Nach Auswaschen nicht gebundener Proteine mit 0.8

Säulenvolumen erfolgte die Elution mit einem $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Gradienten von 1 M auf 0 M über 10 Säulenvolumen.

Chromatographiebedingungen:

Säulenmaterial:	SOURCE 15PHE
Säule:	XK 16/20
Proteinbindungskapazität:	> 25 mg Protein /ml Material
Säulenvolumen:	30 ml
Flußrate:	10 ml/min
Startpuffer:	1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 10 mM Tris, pH 7.8, 10 mM MSH
Elutionspuffer:	10 mM Tris, pH 7.8, 10 mM MSH
Gradient:	linear 1 - 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ über 10 CV
Fraktionsgröße:	9 ml
Detektion:	UV 280 nm

1.4.3 Chromatographie an Macro-PrepCeramic Hydroxyapatite (CHT)

Bei dem keramischen Material Macro-PrepCeramic Hydroxyapatite handelt es sich um eine sphärische, großporige Form von Hydroxyapatit, die durch Sintern bei hohen Temperaturen aus kristallinem Hydroxyapatit hergestellt wird. Das eingesetzte Hydroxyapatit-Material Type I besitzt eine Partikelgröße von 40 μm . Als Säule diente eine XK 16/20-Säule mit einem Innendurchmesser von 1.6 cm und einer Länge von 20 cm.

Zur Äquilibrierung der Säule vor jedem Lauf wurde die Säule mit 2 Säulenvolumen Startpuffer gewaschen. Nach dem Auftrag der Proteinlösung über die Systempumpe, dem Auswaschen von nicht gebundenen Proteinen mit 2 Säulenvolumen Startpuffer erfolgte die Elution mit einem Gradienten von 10 - 200 mM KPi über 15 Säulenvolumen.

Chromatographiebedingungen:

Säulenmaterial:	Macro-PrepCeramic Hydroxyapatite Type I, 40 µm
Säule:	XK 16/20
Proteinbindungskapazität:	>25 mg Lysozym/g Material
Säulenvolumen:	15 ml
Flußrate:	5 ml/min
Startpuffer:	10 mM KPi, pH 7.0, 10 mM MSH (entgast)
Elutionspuffer:	400 mM KPi, pH 7.0, 10 mM MSH (entgast)
Gradient:	linear 10 - 200 mM KPi über 15 CV
Fraktionsgröße:	3 ml
Detektion:	UV 280 nm

1.4.4 Chromatofokussierung an Mono P

Für die Chromatofokussierung wurde eine HR 5/20-Säule mit einem Innendurchmesser von 0.5 mm und einer Länge von 20 cm verwendet. Bei dem Material Mono P handelt es sich um kugelförmige, hydrophile, 10 µm große Harzpartikel. Das Material stellt einen schwachen Anionenaustauscher dar, dessen Oberfläche mit positiv geladenen Aminen beladen ist.

Zu Beginn der Chromatographie wurde die Säule mit Startpuffer auf einen pH-Wert von 6.8 äquilibriert und die Proteinlösung über die Systempumpe aufgetragen. Nach Waschen der Säule mit 0.5 Säulenvolumen Startpuffer erfolgte die Elution mittels eines pH-Gradienten von 6.8 auf 4.0 über 40 Säulenvolumen. Dieser pH-Gradient wird durch den Elutionspuffer Polybuffer 74 erzielt, der aus einer Mischung verschiedener Säure-Base-Paare besteht und durch das Verdrängen des Startpuffers langsam den pH-Wert erniedrigt.

Diese Trennmethode nutzt die Tatsache aus, daß die zu trennenden Proteine unterschiedliche isoelektrische Punkte besitzen. Die Proteine bleiben am Säulenmaterial gebunden, solange sie aufgrund des pH-Wertes deutlich

negativ geladen sind. Wenn die Ionenstärke den für die Bindung erforderlichen Wert unterschreitet, der sich in der Nähe des isoelektrischen Punktes des Proteins befindet, eluieren die Proteine von der Säule. Um die Gefahr eines Aktivitätsverlustes infolge von Konformationsänderungen in der Nähe des isoelektrischen Punktes zu verringern, wurde in den Fraktionsgefäßen 100 µl Puffer (1 M Tris/HCl, 10 mM MSH) mit einem pH-Wert von 7.8 vorgelegt.

Chromatographiebedingungen:

Säulenmaterial:	Mono P
Säule:	HR 5/20
Proteinbindungskapazität:	5 - 10 mg Protein/ml Gel
Säulenvolumen:	4 ml
Flußrate:	1 ml/min
Startpuffer:	25 mM Bis-Tris/HCl, pH 6.8, 10 mM MSH (entgast)
Elutionspuffer:	Polybuffer 74, 1:20, pH 4.0, 10 mM MSH (entgast)
Gradient:	linear pH 6.8 - 4.0 über 40 CV
Fraktionsgröße:	1.4 ml
Detektion:	UV 280 nm

1.4.5 Größenausschlußchromatographie an Superdex 75

Für die Größenausschlußchromatographie wurde eine Superdex 75 HR 10/30-Fertigsäule eingesetzt, die einen Innendurchmesser von 10 mm und eine Länge von 30 cm besitzt. Dieses Gelfiltrationsmedium besteht aus porösen, durch kovalent gebundene Dextranketten quervernetzten Agarose-Kügelchen. Der lineare Trennbereich für globuläre Proteine liegt für dieses Material zwischen 3 und 70 kD, die Partikelgröße beträgt 13 µm. Vor jeder

chromatographischen Trennung wurde die Säule mit zwei Säulenvolumina Puffer äquilibriert. Die Applikation der partikelfreien, eingeeengten Proteinlösung, mit einem Volumen zwischen 0.1 und 1.0 % (25 - 250 µl) des Säulenvolumens, erfolgte über die 2-ml-Probenschleife des Injektionsventils. Die Elution der Proteine erfolgte isokratisch.

Chromatographiebedingungen:

Säulenmaterial:	Superdex 75
Säule:	HR 10/30
Säulenvolumen:	24 ml
Flußrate:	0.5 ml/min
Puffer:	10 mM Tris/HCl, pH 7.8, 100 mM NaCl, 10 mM MSH (entgast)
Elution:	isokratisch
Fraktionsgröße:	1 ml
Detektion:	UV 280 nm

1.4.6 Weitere getestete Chromatographiemethoden

Die im folgenden vorgestellten Chromatographiemethoden wurden als mögliche Trennverfahren zur Reinigung der Vinorin-Synthase getestet. Die Kationenaustauschchromatographie und die Affinitätschromatographie an Coenzym-A-Agarose wurden jedoch nicht in das Reinigungsschema für die Vinorin-Synthase integriert (siehe IV.2.2.7).

1.4.6.1 Kationenaustauschchromatographie

Für den Test auf die Möglichkeit einer Kationenaustauschchromatographie wurde eine nach SOURCE 30Q-Anionenaustauschchromatographie (siehe III.1.4.1.1) erhaltene Vinorin-Synthase-aktive Proteinlösung eingesetzt.

Um ein Protein an einem Kationenaustauscher binden zu können, muß das Protein eine deutlich positive Nettoladung besitzen.

Da der isoelektrische Punkt der Vinorin-Synthase auf Grund der bei der Chromatofokussierung an Mono P erhaltenen Ergebnisse unterhalb von 4.3 liegt (siehe IV.2.2.4), wurde die Proteinlösung mit Citratpuffer nach SÖRENSEN auf einen pH-Wert von 2.5 umgepuffert.

Um zu überprüfen, ob die Aktivität bei so niedrigen pH-Werten erhalten bleibt, wurde die Proteinlösung nach 20 min bei pH 2.5 auf pH 7.8 zurückgepuffert und auf Vinorin-Synthase-Aktivität untersucht.

1.4.6.2 Affinitätschromatographie an Coenzym-A-Agarose

Für die Affinitätschromatographie wurde mit Coenzym A beladene Agarose eingesetzt. An die Agarose sind 3 bis 6 µmol Ligand pro ml Gel immobilisiert woraus eine Bindungskapazität des Materials von 1.000 bis 1.500 U Phosphotransacetylase pro ml Gel resultiert.

Zur Bestimmung der Affinität der Vinorin-Synthase zu dem Material, wurden 500 mg Coenzym-A-Agarose in 5 ml Puffer (10 mM NaAc, 10 mM MSH, pH 6.0) quellen gelassen, in ein Chromatographierohr (1 cm × 10 cm) überführt und mit 5 ml Puffer gewaschen. Unter langsamem Fluß (ca. 0.1 ml/min) wurden 2 ml Proteinlösung, erhalten nach Chromatographie an SOURCE 30Q (siehe III.1.4.1.1) auf die Säule aufgegeben und anschließend mit 5 ml Puffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 mM NaAc-Puffer (pH 6.0, 10 mM MSH).

Sowohl der Durchlauf, als auch die von der Säule eluierte Lösung wurden auf Aktivität getestet.

1.5 Elektrophoretische Methoden

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) diente im Verlauf dieser Arbeit zum einen zur Kontrolle des Reinigungserfolges während der Isolierung, zum anderen in Kombination mit der basischen Nativgelelektrophorese (BNE) zur Identifizierung einer Bande im SDS-Gel als Vinorin-Synthase.

1.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde routinemäßig zur Dokumentation der Anreicherung des Enzyms durch ein Reinigungsschema eingesetzt. Weiterhin konnte sie nach Identifizierung einer Bande als Vinorin-Synthase zur Bestimmung des Molekulargewichts eingesetzt werden (siehe III.3.2).

Bei dieser von SHAPIRO et al.^[81] eingeführten Technik der denaturierenden Gelelektrophorese beruht das Trennprinzip auf den unterschiedlichen Molekülgrößen der Proteine. Die Dodecylsulfatanionen aus dem anionischen Detergenz Natrium-Dodecylsulfat (SDS) lagern sich an die Proteine an, wodurch die Eigenladungen der Proteine effektiv überdeckt werden, so daß Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen. Weiterhin werden durch das Erhitzen der Proteine mit einem Überschuß an SDS bei 95 °C, die Quartär- und Tertiärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst. Bestehende Cystin-Disulfidbindungen werden durch die Zugabe des reduzierenden Thiols Mercaptoethanol (MSH) durch eine Disulfidaustauschreaktion gespalten.

Da die Wanderungsgeschwindigkeit der negativ geladenen SDS-Proteinmicellen fast ausschließlich durch ihre Größe bestimmt ist, eignet sich dieses Verfahren auch zur Bestimmung von Molekülmassen (siehe III.3.2).

Zur quantitativen Abschätzung von Proteinmengen in den Gelen wurde ein BSA-Standard bekannten Gehalts mit auf das Gel aufgetragen (siehe III.1.3).

Die SDS-Elektrophorese in Polyacrylamid-Gelen wurde in einer Vertikal-elektrophorese-Apparatur durchgeführt. Die elektrophoretischen Trennungen erfolgten bei einer Temperatur von 4 °C.

Elektrophoreseparameter:

Laufpuffer:	50 mM Tris 0.2 M Glycin 0.15 % (m/V) SDS
Stromstärke:	15 - 16 mA
Spannung:	ansteigend, begrenzt auf 500 V
Laufzeit:	16 - 18 h

Gelherstellung:

Das Gel besteht aus zwei Bereichen. In einem großporigen Sammelgel werden die Proteine zu einer scharfen Bande konzentriert und werden dann in einem Trenngel mit hoher Gelkonzentration getrennt.

Zur Herstellung des Trenngels wurde die frisch hergestellte Trenngel-Lösung zwischen zwei Glasplatten (16.0 × 18.0 cm, 1.5 cm Abstand) bis zu einer Höhe von ca. 10 cm gegossen und mit Wasser überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von 45 - 60 min wurde das Wasser entfernt und anschließend das Trenngel mit einer frisch hergestellten Sammelgel-Lösung überschichtet und ein Probenauftragskamm mit 15 Probestaschen zwischen die Glasplatten geschoben.

Nach einer Polymerisationszeit des Sammelgels von ca. 30 min konnte das Gel für die Elektrophorese verwendet werden.

Für die Gelherstellung verwendete Lösungen:

Acrylamid-Stammlösung

($T = 30 \%$, $C = 2.7 \%$)

29.2 % (m/V) Acrylamid

0.8 % (m/V) Bis-Acrylamid

Trenngel-Lösung ($T = 11 \%$)

11.0 ml Acrylamid-Stammlösung

7.5 ml 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8

11.2 ml Wasser

membranfiltriert (0.45 μm), entgast

Zugabe unmittelbar vor Gebrauch:

150 μl 20 % (m/V) SDS-Lösung

20 μl TEMED

150 μl 10 % (m/V) APS-Lösung

Sammelgel-Lösung ($T = 5 \%$)

2.5 ml Acrylamid-Stammlösung

3.7 ml 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8

8.5 ml Wasser

membranfiltriert (0.45 μm), entgast

Zugabe unmittelbar vor Gebrauch:

75 μl 20 % (m/V) SDS-Lösung

10 μl TEMED

200 μl 10 % (m/V) APS-Lösung

Probenvorbereitung:

Zur Probenvorbereitung wurden Proteinlösung und Puffer im Verhältnis 2 : 1 (V/V) bis zu einem maximalen Auftragsvolumen von 150 μl für 5 min bei 95 °C erhitzt.

Das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau wandert im Gel etwa so schnell wie die kleinsten Proteine (ca. 15 kD), so daß die Elektrophorese beendet wurde, wenn die Bromphenolblau-Farbfront das untere Ende des Gels erreicht hatte (nach 16 - 18 h).

Probenpuffer

0.2 M Tris/HCl, pH 6.8

40 % (V/V) Glycerin

20 % (V/V) MSH

8 % (m/V) SDS

0.02 % (m/V) Bromphenolblau

1.5.2 Basische Nativgelelektrophorese (BNE)

Die basische Nativgelelektrophorese (BNE) wurde für die Trennung von Proteinmischungen unter nicht denaturierenden Bedingungen genutzt. Sie erfolgte in rehydratisierten Fertiggelen in einem modifizierten Puffersystem, auf der Basis der Disk-Elektrophorese nach ORNSTEIN^[82] und DAVIS^[83] für gewaschene, rehydratisierbare Gele. Durch die Abwesenheit von Substanzen wie Ammoniumpersulfat, TEMED und Monomeren von Acrylamid bleibt die Enzymaktivität bei dieser Elektrophoresetechnik in den meisten Fällen erhalten.

Die Trennung erfolgt auf Grund des Verhältnisses Molekülgröße zu effektiver Ladung. Bei dem vorliegenden pH-Wert von 8.9 sind alle Proteine negativ geladen und wandern zur Anode.

Die Elektrophorese wurde in einer Horizontalelektrophorese-Apparatur durchgeführt. Die Trennungen erfolgten bei einer Temperatur von 4 °C.

Elektrophoresebedingungen:

Anodenpuffer: 0.175 M Tris/HCl, pH 8.9

Kathodenpuffer: 0.567 M Glycin

Die Laufbedingungen wurden entsprechend den Herstellerangaben gewählt.

Für ein halbes Gel gilt:

Zeit	Spannung	Stromstärke
10 min	300 V	9 mA
60 min	900 V	25 mA

Die Elektrophorese wurde beendet, wenn der Farbstoff Bromphenolblau den Anoden-Streifen erreichte.

Rehydratisierung des Trockengels:

Verwendet wurden CleanGel 25S-Trockengele ($250 \times 110 \times 0.5$ mm) mit einem Trenngelbereich ($T = 10\%$) sowie einem Sammelgelbereich ($T = 5\%$), in dem die Probenaufgabetaschen einpolymerisiert sind.

Das auf die benötigte Größe zugeschnittene Gel wurde in der entsprechenden Menge Puffer 60 min in der Quellkammer des GelPools rehydratisiert.

Rehydratisierungspuffer

0.375 M Tris/HCl, pH 8.9

0.005 % (m/V) Bromphenolblau

Probenvorbereitung:

Die Proben wurden unverdünnt oder nach Konzentrierung mit Einwegkonzentratoren (siehe III.1.2.3) in Fraktionen von je $17 \mu\text{l}$ in die Probentaschen pipettiert.

1.5.3 Kombination SDS-PAGE und BNE

Ziel der Kombination der beiden elektrophoretischen Methoden BNE und SDS-PAGE war es, mit Hilfe von Gelbereichen der BNE, die Enzymaktivität aufzuweisen, in der zweiten Dimension die Vinorin-Synthase im SDS-Gel einer Proteinbande zuordnen zu können.

Zu diesem Zweck wurde in der ersten Dimension eine BNE unter nicht denaturierenden Bedingungen durchgeführt (siehe III.1.5.2). Nach der Elektrophorese wurde das Gel parallel zur Trennrichtung zerschnitten und die einzelnen Querstreifen per Enzymaktivitätstest (siehe III.2.3) auf das Vorliegen von Vinorin-Synthase untersucht. Der nicht für diese Untersuchung benötigte Teil des Gels konnte danach für die zweite Dimension, der SDS-PAGE, verwendet werden.

Dazu wurde das Pellet mit 50 µl SDS-PAGE-Probenpuffer (siehe III.1.5.1) versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt. Die so erhaltenen Gelfragmente wurden vollständig in die Probentaschen der Vertikalgelelektrophorese-Apparatur überführt und anschließend eine Elektrophorese unter den in III.1.5.1 beschriebenen Bedingungen durchgeführt.

1.5.4 Färbemethoden

Nach jeder elektrophoretischen Trennung wurden in Abhängigkeit vom Proteingehalt die unterschiedlich empfindlichen Färbemethoden Coomassie-Färbung oder Silberfärbung eingesetzt.

1.5.4.1 Coomassie-Färbung

Mit Hilfe der Coomassie-Färbung können Proteinmengen von minimal 0.1 - 0.3 µg pro Bande in Elektrophoresegelen detektiert werden.

Im ersten Schritt wurden die Gele ca. 30 min unter leichtem Schütteln in die Färbelösung gelegt. Da der Farbstoff an Proteine besser bindet als an die

Gelstrukturen, konnte anschließend unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung das Gel solange entfärbt werden, bis nur noch Proteine als blaue Banden sichtbar waren.

Verwendete Lösungen:

<i>Färbelösung</i>	<i>Entfärbelösung</i>
0.25 % (m/V) Coomassie Blue R-250	30 % (V/V) Methanol
45 % (V/V) Methanol	9 % (V/V) Essigsäure
9 % (V/V) Essigsäure	

1.5.4.2 Silberfärbung

Mit der nach HEUKESHOVEN und DERNICK^[84] durchgeführten Silberfärbung können minimal 1 - 30 ng Protein pro Bande sichtbar gemacht werden.

Für die Silberfärbung wurden die Gele unter leichtem Schütteln zunächst zweimal je 30 min in die Fixierlösung und 60 min in die Inkubationslösung gelegt. Anschließend wurden sie dreimal je 10 min mit Wasser gewaschen und 20 min unter Lichtausschluss in der Silberlösung inkubiert. Nach kurzem Abspülen mit Wasser wurde das Gel so lange in die Entwicklerlösung gelegt, bis deutliche Banden sichtbar wurden. Die Entwicklung wurde dann mit 10%iger Essigsäure abgestoppt.

Verwendete Lösungen:

<i>Fixierlösung</i>	<i>Silberlösung</i>
30 % (V/V) Ethanol	0.2 % (m/V) Silbernitrat
10 % (V/V) Essigsäure	0.01 % (m/V) Formaldehyd

Entwicklerlösung

2.5 % (m/V) Natriumcarbonat

0.02 % (m/V) Formaldehyd

Inkubationslösung

30 % (V/V) Ethanol

6.8 % (m/V) Natriumacetat

0.125 % (m/V) Glutardialdehyd

0.2 % (m/V) Natriumthiosulfat $\times 5 \text{ H}_2\text{O}$

Die Zugabe des Formaldehyds, des Glutardialdehyds und des Thiosulfats zu den entsprechenden Lösungen erfolgte erst unmittelbar vor Gebrauch.

2 Bestimmung der Enzymaktivität

Nach jedem säulenchromatographischen Reinigungsschritt mußte die Enzymaktivität der Vinorin-Synthase in den gesammelten Fraktionen bestimmt werden. Als Testsysteme standen dazu ein optimierter, von OBITZ^[85] entwickelter zweistufiger Test, sowie ein neu entwickelter einstufiger Test mit Gardneral als Substrat zur Verfügung.

2.1 Enzymtest mit Gardneral als Substrat

Für die routinemäßige Bestimmung von Enzymaktivitäten wurde ein Test etabliert, der geeignet ist, innerhalb kürzester Zeit sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen über die Enzymaktivitäten zu machen.

Zur Bestimmung der Enzymaktivität mit Gardneral als Substrat wurden die Lösungen zunächst nach dem in Tabelle 2 angegebenen Schema pipettiert.

Tabelle 2: Pipettierschema zur Bestimmung der Enzymaktivität - Substrat Gardneral

Bestandteil	Volumen [μ l]	Endkonzentration	Menge pro Ansatz
2 mM Gardneral	10	0.15 mM	20 nmol
10 mM Acetyl-Coenzym A	10	0.75 mM	100 nmol
1 M Tris/HCl, pH 7.8	5	40 mM	
Enzymlösung	50		
Wasser	60		

Der Ansatz wurde 30 min bei 30 °C inkubiert und anschließend die enzymatische Reaktion durch Reduktion der Aldehydgruppen mittels Zugabe von 2 μ l 0.1 N HCl und 5 μ l 1%iger NaBH₄-Lösung gestoppt. Nach Denaturierung der Proteine mit 200 μ l MeOH und Zentrifugation für 5 min bei 18000 \times g wurde der Überstand zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der Aktivität mittels HPLC (siehe III.4) genutzt.

2.2 Enzymtest mit 16-epi-Vellosimin als Substrat

Das endogene Substrat der Vinorin-Synthase, 16-epi-Vellosimin, epimerisiert mit einer Halbwertszeit von ca. 20 min nicht-enzymatisch zu dem vom Enzym nicht als Substrat akzeptierten Vellosimin. Aus diesem Grund ist es notwendig, das Substrat in einem ersten Schritt des Tests enzymatisch aus PNA mit Hilfe des Enzyms PNA-Esterase zu generieren.

Die Bestimmung der Aktivität der für den ersten Schritt des Tests benötigten PNA-Esterase-Lösung erfolgte unter Verwendung des im folgenden beschriebenen Enzymtests. Die PNA-Esterase wurde dann für den anschließenden Enzymtest zur Ermittlung der Enzymaktivität der Vinorin-Synthase eingesetzt, um mit ihr das benötigte 16-epi-Vellosimin als Substrat bereitzustellen.

Die nach der ersten Säule eines Reinigungsschemas erhaltene und identifizierte Fraktion mit PNA-Esterase-Aktivität wurde dann für alle weiteren Enzymtests während der Reinigung verwendet.

2.2.1 Enzymtest zur Bestimmung der Aktivität der PNA-Esterase

Der Testansatz zur Bestimmung der Enzymaktivität der PNA-Esterase wurde zunächst nach dem in Tabelle 3 angegebenen Schema zusammenpipettiert.

Tabelle 3: Pipettierschema zur Bestimmung der Enzymaktivität der PNA-Esterase

Bestandteil	Volumen [μ l]	Endkonzentration	Menge pro Ansatz
2 mM PNA	5	0.15 mM	10 nmol
Enzymlösung	15		
Wasser	50		

Anschließend wurde der Ansatz unter Schütteln (750 rpm) bei 30 °C 15 min inkubiert.

Durch Zugabe von 2 μ l 0.1 N HCl und 5 μ l 1%iger NaBH₄-Lösung erfolgte die Reduktion der Aldehydgruppen und damit ein Ende der enzymatischen Reaktion. Danach wurden die Proteine durch Zugabe von 200 μ l MeOH denaturiert.

Nach Zentrifugation für 5 min bei 18000 \times g konnte der Überstand zur Auswertung der Aktivität mittels HPLC (siehe III.4) genutzt werden.

2.2.2 Enzymtest zur Bestimmung der Aktivität der Vinorin-Synthase mit 16-epi-Vellosimin als Substrat

Die Bestimmung der Aktivität der Vinorin-Synthase mit dem Substrat 16-epi-Vellosimin erfolgte in zwei Stufen nach dem in Tabelle 4 angegebenen Pipettierschema.

Tabelle 4: Pipettierschema zur Bestimmung der Enzymaktivität der Vinorin-Synthase - Substrat 16-epi-Vellosimin

Bestandteil	Volumen [μ l]	Endkonzentration	Menge pro Ansatz
2 mM PNA	10	0.25 mM	20 nmol
PNA-Esterase-Lösung	15		
Wasser	50		
Inkubation 20 min bei 30 °C			
10 mM Acetyl-Coenzyme A	10	0.70 mM	100 nmol
1 M Tris/HCl, pH 7.8	5	35 mM	
Enzymlösung	50		

Zunächst wurde die erste Stufe des Ansatzes pipettiert, 20 min bei 30 °C unter Schütteln (750 rpm) inkubiert, anschließend Acetyl-CoA, Puffer und die Enzymlösung zupipettiert und erneut bei 30 °C unter Schütteln (750 rpm) für 40 min inkubiert.

Nach Abstoppen der Reaktion durch Zugabe von 2 μ l 0.1 N HCl und 5 μ l 1%iger NaBH₄-Lösung wurden durch Zugabe von 200 μ l MeOH die Proteine denaturiert.

Der nach Zentrifugation (5 min, 18000 \times g) erhaltene Überstand wurde dann für die HPLC-gestützte Bestimmung der Enzymaktivität verwendet (siehe III.4).

2.3 Enzymtest zur Bestimmung der Enzymaktivität in BNE-Gelen

Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte in Anlehnung an den neu entwickelten Enzymtest zur Bestimmung der Aktivität der Vinorin-Synthase mit Gardneral als Substrat.

Das in kleine Stücke zerschnittene BNE-Gel wurde zunächst in ein Reaktionsgefäß (1.5 ml) überführt und 50 µl Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.8, 10 mM MSH) zugegeben. Nach Zugabe der für den Aktivitätstest notwendigen Lösungen nach dem in Tabelle 5 angegebenen Pipettierschema wurde der Ansatz 60 min bei 30 °C inkubiert.

Tabelle 5: Pipettierschema zur Bestimmung der Enzymaktivität in BNE-Gelen

Bestandteil	Volumen [µl]	Menge pro Ansatz
2 mM Gardneral	20	40 nmol
10 mM Acetyl-Coenzym A	10	100 nmol
Wasser	50	

Nach Abstoppen der Reaktion durch die Zugabe von 2 µl 0.1 N HCl und 5 µl 1%iger NaBH₄-Lösung sowie Zugabe von 200 µl MeOH wurde der nach Zentrifugation (5 min, 18000 × g) erhaltene Überstand für die Untersuchung des Überstandes mittels HPLC (siehe III.4) genutzt.

3 Bestimmung von Molekulargewichten

Die Größe von Proteinen wurde mittels Größenausschlußchromatographie sowie SDS-PAGE bestimmt. Mit diesen Methoden lassen sich die molekularen Massen bis auf wenige Prozent genau ermitteln.

3.1 Größenausschlußchromatographie

Bei der Größenausschlußchromatographie, die auf der unterschiedlichen Permeation der Analyten in ein poröses Material mit kontrollierter Porengröße basiert, werden gelöste Moleküle nach ihrer Größe getrennt. Nach Eichung der Säule mit Proteinen, deren Molekulargewicht bekannt ist, kann bei Annahme einer globulären Struktur und gleicher Ladungsdichte aus dem Elutionsvolumen des zu untersuchenden Proteins das Molekulargewicht berechnet werden.

Die unter III.1.4.5 beschriebene Größenausschlußchromatographie an Superdex 75 wurde neben der Proteinisolierung auch zur Größenbestimmung von Proteinen eingesetzt.

Zur Eichung der Gelfiltrationssäule wurde die in Tabelle 6 angegebene Markerproteinmischung verwendet.

Die halblogarithmische Auftragung des Elutionsvolumens der Markerproteine gegen die relative Molekülmasse ergibt eine Gerade, mit deren Hilfe die Größe eines unbekanntes Proteins ermittelt werden kann.

Tabelle 6: Zusammensetzung der Markerproteinmischung für die Größenausschlußchromatographie

Protein	Relative Molekülmasse [kD]
Albumin (Rinderserum)	68.0
Albumin (Hühnerei)	45.0
Chymotrypsinogen	25.0

3.2 SDS-PAGE

In bestimmten Bereichen der Elektrophorese in Polyacrylamidgelen mit 0.1 % SDS erhält man eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Molekulargewichte und den Wanderungstrecken der Micellen. Unter Verwendung von Eichproteinen lassen sich die Molekulargewichte der Proteine ermitteln.

Die Kalibrierung der SDS-Gele erfolgte mit Hilfe einer Standardproteinmischung (*LMW Electrophoresis Calibration Kit*) (siehe Tabelle 7).

Aus der sich durch halblogarithmische Auftragung der elektrophoretischen Mobilitäten der Markerproteine gegen ihre relativen Molekülmassen erhaltenen Gerade konnte das Molekulargewicht von Proteinen ermittelt werden.

Tabelle 7: **Zusammensetzung der Markerproteinmischung *LMW Electrophoresis Calibration Kit***

Protein	Relative Molekülmasse [kD]
Phosphorylase b	97.0
Albumin	66.0
Ovalbumin	45.0
Carboanhydrase	30.0
Trypsin-Inhibitor	20.1
α -Lactalbumin	14.4

4 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC-Analytik wurde zur Bestimmung von Enzymaktivitäten während der Proteinreinigung eingesetzt.

Sowohl die Bestimmung der Aktivität der PNA-Esterase als auch der Aktivität der Vinorin-Synthase erfolgte unter den folgenden angegebenen Chromatographiebedingungen.

Chromatographiebedingungen:

Säule:	Lichrospher 60 RP-select B Säulengröße: 250 mm × 4 mm
Vorsäule:	RP-select B Säulengröße: 4 mm × 4 mm
Flußrate:	1.0 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Detektion:	UV 225 nm
Eluenten:	Eluent A: H ₂ O, pH 2.3 Eluent B: Acetonitril
Gradient:	

Zeit [min]	Anteil Eluent A [%]	Anteil Eluent B [%]
0	72	28
6.0	65	35
6.5	20	80
8.5	20	80
9.0	72	28
14.0	72	28

5 **Synthese von Polyneuridinaldehyd aus Quebrachidin**

Die Synthese von Polyneuridinaldehyd (PNA) aus Quebrachidin erfolgte durch Oxidation mit Bleitetraacetat im unpolaren Lösungsmittel Benzol in Anlehnung an eine Vorschrift von BARTLETT et al.^[50] zur Synthese von Deoxyajmalal A aus 21-Deoxyajmalin.

Nach dünnschichtchromatographischer Reinigung konnte PNA in einer Ausbeute von ca. 30 % gewonnen werden.

IV ERGEBNISSE

1 Nachweis der Vinorin-Synthase

Der Erfolg einer Reinigung eines zuvor noch nicht homolog gewonnenen Proteins hängt im wesentlichen von der Bestimmung von Enzymaktivitäten in den durch chromatographische Methoden erhaltenen Fraktionen ab. Durch die zunächst qualitative, aber vor allem auch quantitative Bestimmung von Enzymaktivitäten ist es möglich den jeweiligen Reinigungsschritt zu bewerten und zu optimieren, sowie die Fraktionen für die weitere Aufreinigung auszuwählen.

1.1 Enzymtest mit dem Substrat 16-epi-Vellosimin

Zu Beginn der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Reinigungsprotokolle wurde der von OBITZ^[85] entwickelte zweistufige Enzymaktivitätstest genutzt.

Das Substrat der Vinorin-Synthase, 16-epi-Vellosimin, epimerisiert bei dem für den Enzymtest benötigten pH-Wert von 7.8 mit einer Halbwertszeit von ca. 20 min.

Um die Reinigung der Vinorin-Synthase während eines Reinigungsprotokolls mit Hilfe des Enzymaktivitätstests verfolgen zu können, mußte aufgrund dieser geringen Stabilität 16-epi-Vellosimin in einem ersten Schritt aus Polyneuridinaldehyd (PNA) unter Verwendung eines PNA-Esterase-Extraktes hergestellt werden. Nach der ersten säulenchromatographischen Trennung wurden zunächst die Fraktionen auf PNA-Esterase-Aktivität untersucht (siehe III.2.2.1).

Der so erhaltene PNA-Esterase-Extrakt, der keine Vinorin-Synthase-Aktivität enthielt, wurde dann für sämtliche nachfolgende Enzymaktivitätstests einer Reinigung eingesetzt. Die Lagerung des Extraktes erfolgte bei 4 °C mit einer ausreichenden Stabilität für ca. 8 Wochen.

Im zweiten Schritt des Enzymaktivitätstests wurde durch Zusatz von Acetyl-CoA und der zu testenden Enzymlösung die Bildung von Vinorin katalysiert (siehe III.2.2.2). Nach Inkubation des Reaktionsansatzes und Reduktion der Aldehyde mit Natriumborhydrid zu den entsprechenden Alkoholen (siehe Abbildung 5) wurde der nach Zentrifugation erhaltene Überstand mittels HPLC untersucht (siehe III.4).

Eine Übersicht der im Testansatz enthaltenen Alkaloide und der zu trennenden Reduktionsprodukte gibt Abbildung 5.

Eine Reduktion von Vinorin konnte nicht beobachtet werden. Der Vergleich der Retentionszeiten des Peaks einer mit Natriumborhydrid reduzierten Vinorin-Lösung mit einer nicht reduzierten Vinorin-Lösung ergaben keine signifikante Abweichung in der Retentionszeit.

Vinorin ($R_t = 5.1$ min, **4**) und die Reduktionsprodukte der Alkaloide 16-epi-Vellosimin ($R_t = 3.6$ min, **1**) und Vellosimin ($R_t = 4.1$ min, **2**) konnten innerhalb von 6 min getrennt werden, bei einer Gesamtlauzeit des Elutionsprogramms von 14 min (siehe Abbildung 4).

Wie im Chromatogramm (siehe Abbildung 4) deutlich zu sehen, wurde im ersten Schritt das eingesetzte PNA nicht vollständig zu 16-epi-Vellosimin umgesetzt. Wie weitere Experimente zeigten, führten auch Verlängerungen der ersten Inkubationszeit nicht zu einem vollständigen Umsatz von PNA.

Außerdem führte eine weitere Verlängerung der Inkubationszeit dazu, daß das entstandene 16-epi-Vellosimin in größerem Umfang zum nicht mehr von der Vinorin-Synthase als Substrat akzeptierten Vellosimin epimerisierte, so daß die damit einhergehenden verlängerten Testzeiten und damit der erhöhte Zeitaufwand pro Testansatz nicht sinnvoll waren.

Prinzipiell hätte sich das PNA innerhalb der Inkubationszeit vollständig umsetzen lassen, wenn eine deutlich höhere Aktivität an PNA-Esterase zum Einsatz gekommen wäre. Dieses war nicht ohne weiteres möglich, da die zur Verfügung stehende Menge dieses Enzyms durch seine Gewinnung nach dem ersten Säulenschritt begrenzt war.

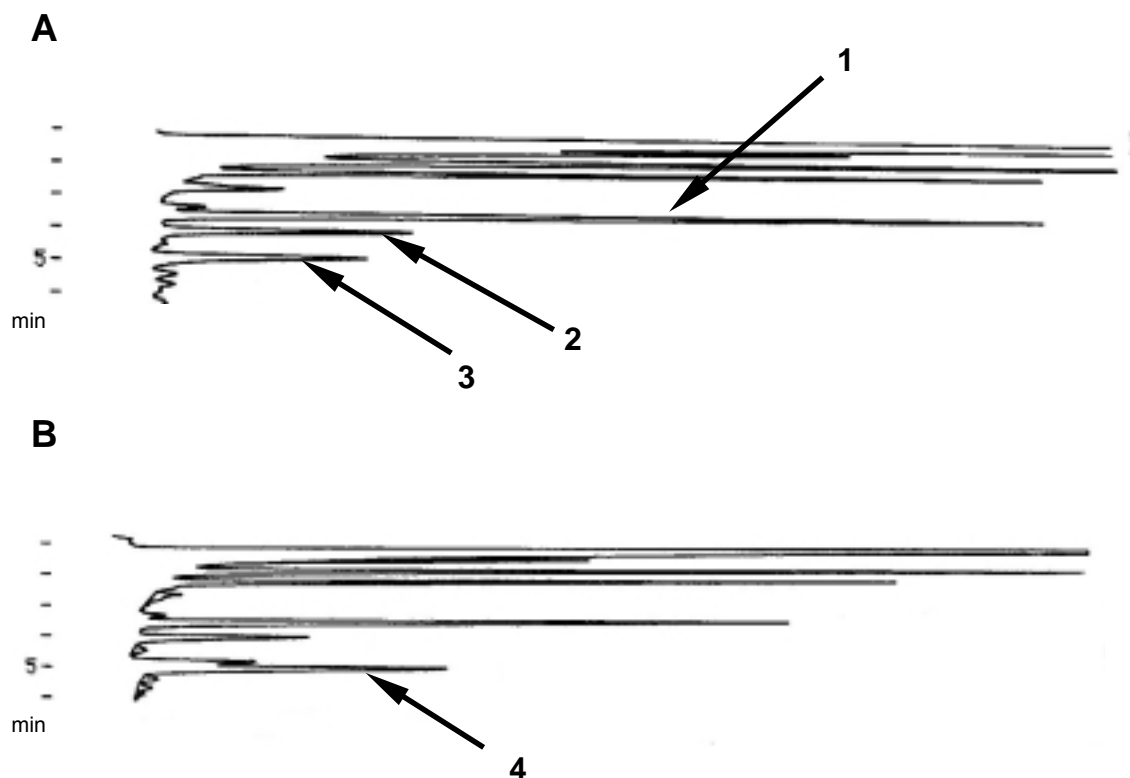


Abbildung 4: HPLC-Chromatogramm zur Aktivitätsbestimmung der Vinorin-Synthase mit dem Substrat 16-epi-Vellosimin

Zu den Chromatographiebedingungen siehe III.4.1.

A Assay ohne Enzymaktivität

B Assay mit Enzymaktivität

Formeln siehe Abbildung 5

1 16-epi-10-Deoxysarpagin

2 10-Deoxysarpagin

3 Polyneuridin

4 Vinorin

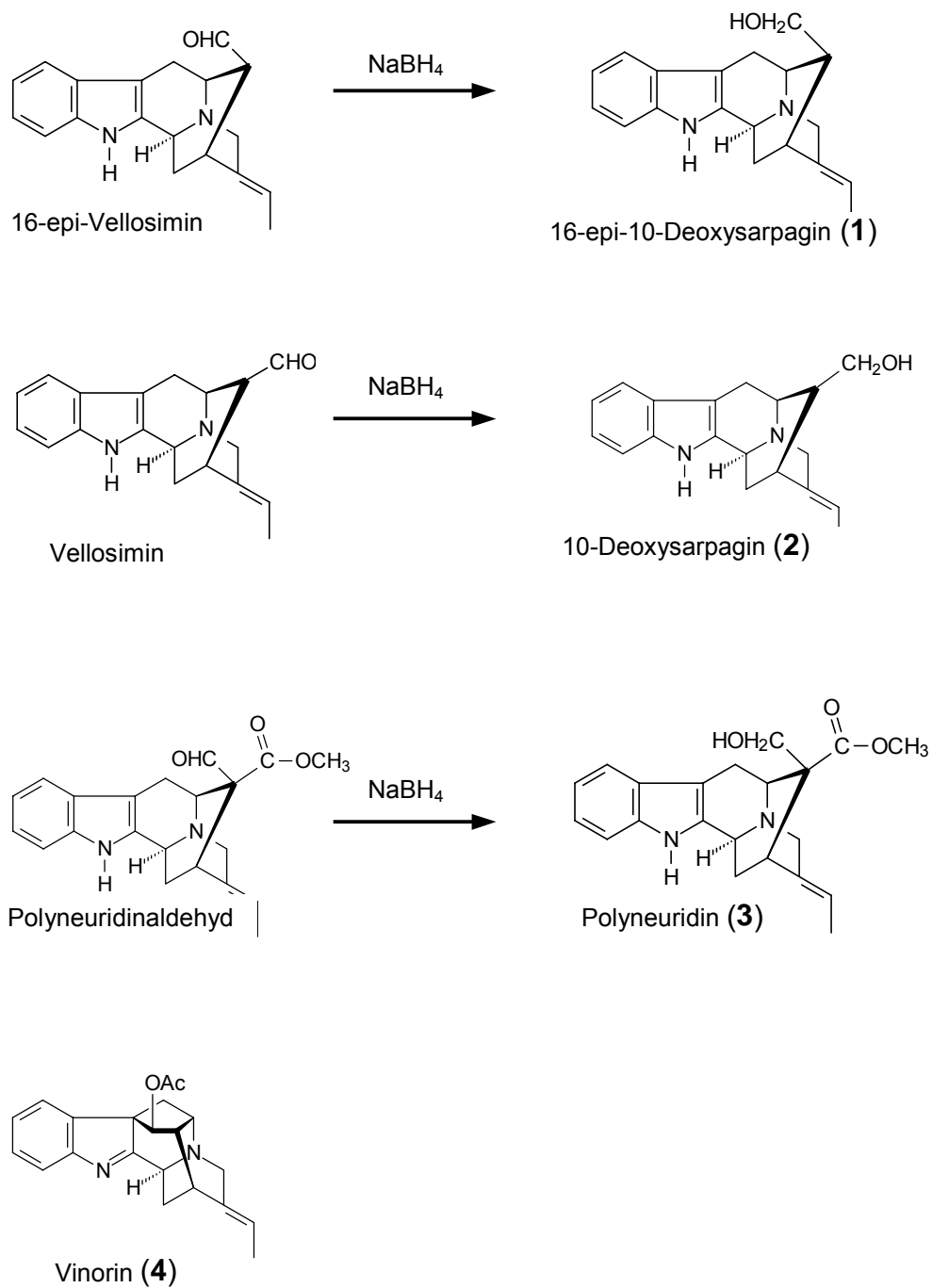


Abbildung 5: Im Testansatz zur Bestimmung der Enzymaktivität mit 16-epi-Vellosimin enthaltene Alkaloide und deren Reduktionsprodukte mit NaBH₄

Die in den Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der in Abbildung 4 verwendeten Beschriftung.

Mit Hilfe dieses Tests auf der Grundlage von 16-epi-Vellosimin ist lediglich eine qualitative Aussage über eine vorhandene Vinorin-Synthase-Aktivität verlässlich möglich. Quantitative Aussagen sind nur in Form einer Tendenz möglich. Da die optimale Nutzung einer Säule auch auf der Aussage über die spezifische Aktivität der Vinorin-Synthase basiert, ermöglicht dieser Enzymaktivitätstest aufgrund seiner Aussagemöglichkeiten lediglich eine wenig optimierte Reinigung der Vinorin-Synthase.

Das für den ersten Schritt des Enzymtests notwendige Substrat der PNA-Esterase, Polyneuridinaldehyd, ist durch die Synthese aus Quebrachidin zugänglich (siehe III.5). Die unserem Arbeitskreis zur Verfügung stehende Quebrachidinmenge (ca. 50 mg) ist jedoch stark begrenzt und weiteres Quebrachidin nicht ohne weiteres zugänglich. Deshalb war neben den oben genannten Gründen auch infolge der Limitierung der zur Verfügung stehenden Menge an Polyneuridinaldehyd, die Entwicklung eines weiteren ohne großen Zeitaufwand durchführbaren Aktivitätstests sinnvoll.

1.2 Entwicklung eines Enzymtests mit dem Substrat Gardneral

Aus den unter IV.1.1 genannten Gründen wurde ein neuer Enzymaktivitätstest entwickelt.

Neben 16-epi-Vellosimin ($K_M = 19.4 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 5 \text{ pkat}$) wird von der Vinorin-Synthase nur dessen 11-Methoxyderivat Gardneral ($K_M = 39 \mu\text{M}$, $V_{\text{max}} = 4.3 \text{ pkat}$) als Substrat akzeptiert^[66]. Das zur Verfügung stehende Gardneral wurde synthetisch hergestellt*.

Gardneral zeigt im Gegensatz zu 16-epi-Vellosimin eine deutlich langsamere Epimerisierung, so daß es direkt als Substrat eingesetzt werden kann.

* Das zur Verfügung stehende Gardneral stammt von Prof. S. Sakai (Chiba, Japan).

Die Inkubation des nun einstufigen Aktivitätstestansatzes erfolgte 30 min bei 30 °C und stellt damit gegenüber dem zweistufigen Aktivitätstest der bisher in unserem Arbeitskreis verwendet wurde sowohl eine deutliche Minimierung des Arbeitsaufwandes, da nur ein Pipettierschritt notwendig ist, als auch eine Zeitersparnis, infolge der Verkürzung der Inkubationszeit, dar.

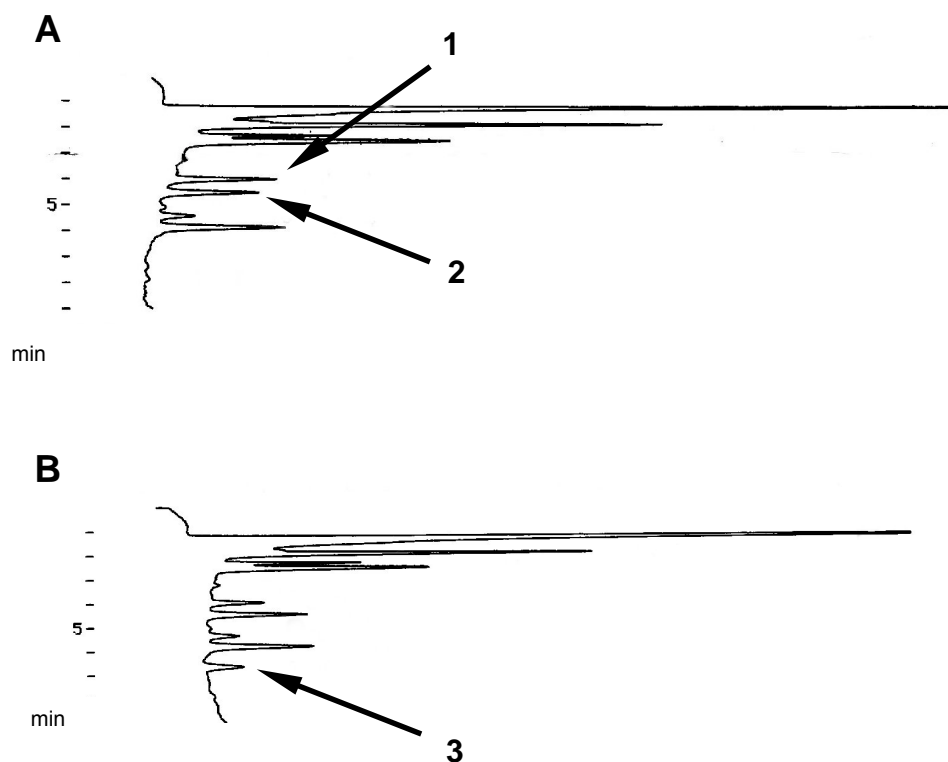


Abbildung 6: HPLC-Chromatogramm zur Aktivitätsbestimmung der Vinorin-Synthase mit dem Substrat Gardneral

Zu den Chromatographiebedingungen siehe III.4.1.

A Assay ohne Enzymaktivität

B Assay mit Enzymaktivität

Formeln siehe Abbildung 7.

1 16-epi-11-Methoxy-10-deoxysarpagin

3 11-Methoxy-vinorin

2 11-Methoxy-10-deoxysarpagin

Nach Inkubation des zu testenden Proteinextraktes mit Gardneral und Acetyl-CoA (siehe III.2.1) wurden, wie auch beim Test mit PNA/16-epi-Vellosimin, zur Verbesserung der Trennung die Aldehydgruppen mit Natriumborhydrid zu den entsprechenden Alkoholen reduziert (siehe Abbildung 7). Die anschließende HPLC-Untersuchung erfolgte unter den in III.4 angegebenen chromatographischen Bedingungen.

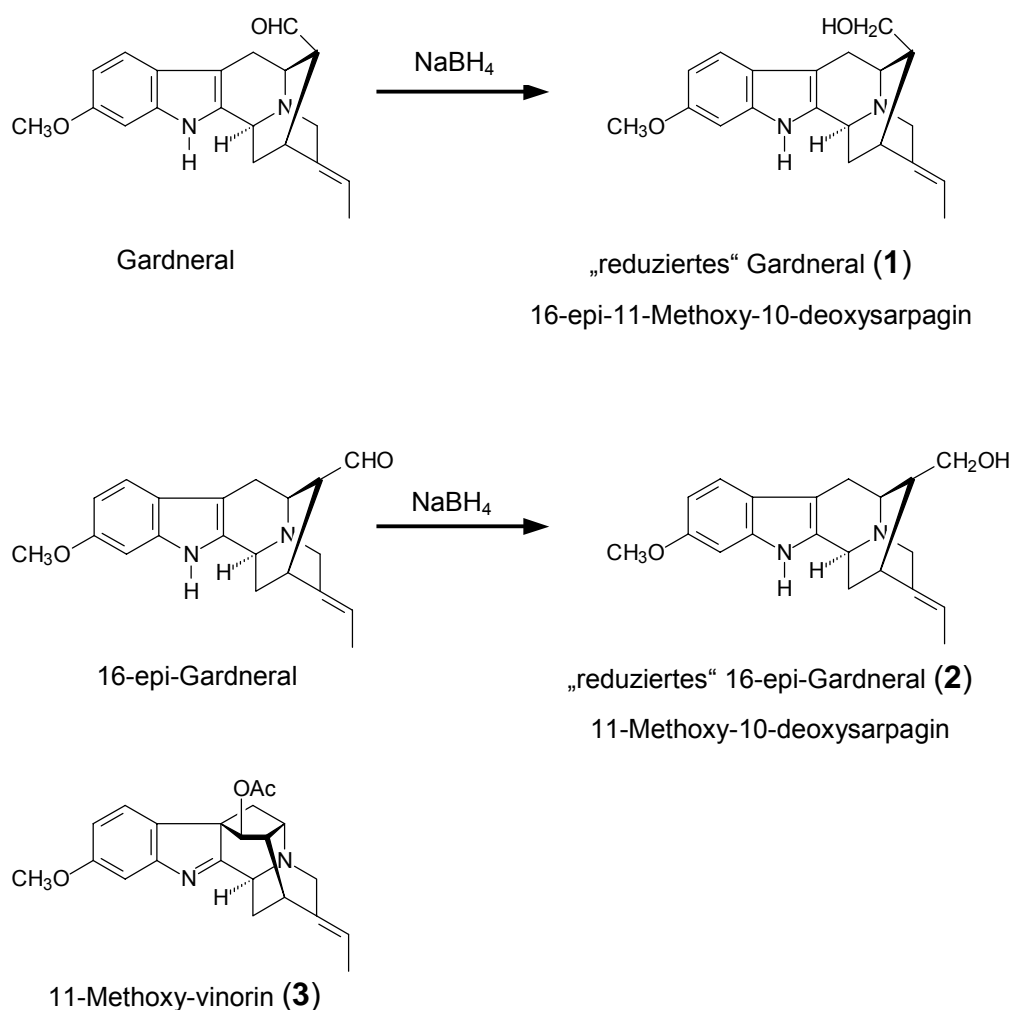


Abbildung 7: Im Testansatz zur Bestimmung der Enzymaktivität mit Gardneral enthaltene Alkaloide und deren Reduktionsprodukte mit NaBH₄

Die in den Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der in Abbildung 6 verwendeten Beschriftung.

Die Retentionszeiten betragen für die Reduktionsprodukte der Alkaloide Gardneral (**1**) 4.0 min, epi-Gardneral (**2**) 4.5 min und 11-Methoxy-vinorin (**3**) 6.7 min (siehe Abbildung 6). Der Peak des 11-Methoxy-vinorins (**3**) erscheint im Gegensatz zu Vinorin im Test mit 16-epi-Vellosimin (siehe Abbildung 6) getrennt von allen anderen Peaks.

Mit Hilfe des Enzymtests auf der Grundlage von Gardneral als Substrat ist nun eine schnelle qualitative und quantitative Aussage über Aktivitäten der Vinorin-Synthase möglich. Eine optimale Ausnutzung der eingesetzten Säulen ist damit möglich (siehe IV.2.2).

Zusammenfassend zeichnet sich der neu entwickelte Aktivitätstest zur Bestimmung der Vinorin-Synthase im Gegensatz zu dem bislang verwendeten zweistufigen Enzymtest durch Verringerung des Zeitaufwandes, der Möglichkeit der Quantifizierung sowie der leichteren Zugänglichkeit zum Substrat aus.

2 Reinigung der Vinorin-Synthase

Für die Reinigung der Vinorin-Synthase wurde eine Reihe unterschiedlicher Reinigungsprotokolle erarbeitet und ihr Erfolg mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese dokumentiert.

Im folgenden werden zunächst sämtliche chromatographischen Reinigungsmethoden, die getestet und optimiert wurden, vorgestellt. Durch die Überprüfung der Proteinreinigung mittels SDS-Gelelektrophorese konnte das Reinigungsschema optimiert werden (siehe IV.2.5).

2.1 Herstellung eines Proteinrohextraktes und fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Zu Beginn dieser Arbeit wurden die Proteinrohextrakte aus nur ca. 3.5 kg Zellkulturgewebe hergestellt. Später wurden die Aufschlüsse mit bis zu 10 kg Zellkulturgewebe durchgeführt. Zum einen wurde dadurch eine maximal große Proteinmenge erhalten, so daß am Ende einer Reinigung eine ausreichende Menge an gereinigter Vinorin-Synthase im SDS-Gel für die Bestimmung interner Aminosäuresequenzen zur Verfügung stehen sollte, zum anderen konnten durch die Verwendung großer Mengen für den Aufschluß mehrere neue Säulen oder unterschiedliche Reinigungsprotokolle parallel im Hinblick auf eine Optimierung der Reinigung untersucht werden.

Die Herstellung der Proteinrohextrakte aus bis zu 10 kg tiefgefrorenem Zellkulturgewebe der Linien *Rauvolfia serpentina* „T 30“, *Rauvolfia serpentina* „München“, *Rauvolfia serpentina* × *Rhazya stricta* (siehe II.1) erfolgte nach der in III.1.1 beschriebenen Methode.

Die erste Fällung trennt durch portionsweise Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 30 % Mikrosomen und höhermolekulare Partikel ab.

Die nach der zweiten Fällung erhaltenen löslichen Proteine wurden nach Zentrifugation in Startpuffer der Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q (10 mM Tris/HCl, 10 mM MSH, pH 7.8) resolvatisiert und nach Dialyse über Nacht sowie erneuter Zentrifugation für die nachfolgende chromatographische Reinigung eingesetzt.

2.2 Chromatographische Trennungen

Im folgenden wird das Elutionsverhalten der Vinorin-Synthase an den getesteten Chromatographiematerialien beschrieben und anschließend das darauf abgestimmte, optimierte Reinigungsschema dargestellt.

Für diese Untersuchungen wurden ausschließlich Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* der Zelllinie „T 30“ verwendet.

2.2.1 Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q

Der für diese erste Reinigung eingesetzte starke Anionenaustauscher SOURCE 30Q zeichnet sich vor allem auf Grund der porösen Eigenschaften und der gleichmäßigen Partikelgröße des Materials dadurch aus, daß es das Arbeiten bei hohen Flußraten mit vergleichsweise geringen Drücken erlaubt. Die kurzen Laufzeiten werden möglich, da die Partikel eine große Oberfläche für die Bindung der Proteine und somit eine hohe Bindungskapazität besitzen. Durch die besonderen Eigenschaften des eingesetzten Materials SOURCE 30Q war es somit möglich, Proteinrohextrakte aus bis zu 10 kg Zellkultur-gewebe mit geringem Zeitaufwand und ohne größere Verluste an Enzym-aktivität anzureichern.

Die Trennung erfolgte bei pH 7.8, d.h. etwa 3 pH-Einheiten über dem von PFITZNER et al.^[66] mittels Chromatofokussierung bestimmten isoelektrischen Punkt für die Vinorin-Synthase von pH 4.4, so daß für die Bindung eine ausreichend große negative Nettoladung der Moleküle vorlag.

Für die chromatographische Reinigung an SOURCE 30Q wurden Proteinrohextrakte (siehe III.1.1) eingesetzt. In Abbildung 8 ist ein typisches Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q dargestellt. Die Trennung wurde unter den in III.1.4.1.1 angegebenen chromatographischen Bedingungen durchgeführt.

Die Elution der Vinorin-Synthase erfolgte mit Hilfe eines ansteigenden KCl-Gradienten (0 - 0.5 M) bei einer KCl-Konzentration von 0.27 – 0.37 M (18 – 25 mS/cm). Das Aktivitätsmaximum lag bei 0.32 M KCl (21 mS/cm).

Für die weiteren Reinigungsschritte wurden die Fraktionen mit einer spezifischen Aktivität größer als 1.0 pkat/mg vereinigt.

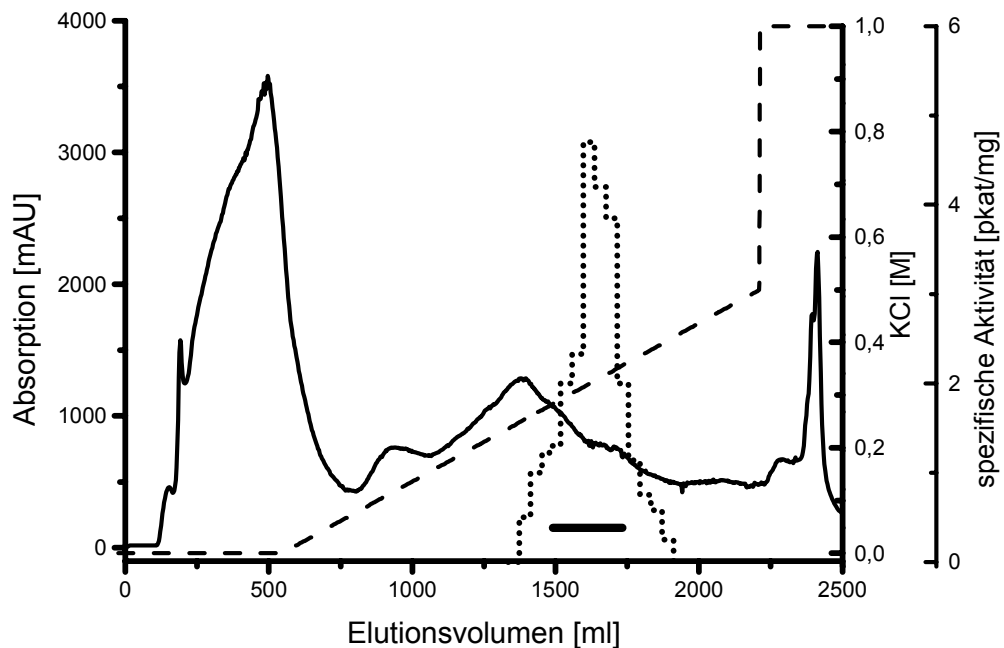


Abbildung 8: Reinigung der Vinorin-Synthase – Elutionsprofil der Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q

- UV-Absorption ($\lambda=280$ nm)
- - - KCl-Gradient
- Spezifische Aktivität [pkat/mg]

Die mit einem Balken gekennzeichneten Fraktionen wurden für die weitere Reinigung verwendet.

Schon das Elutionsprofil (siehe Abbildung 8) läßt erkennen, daß durch diesen Reinigungsschritt eine große Menge Fremdprotein abgetrennt werden kann, so daß mit dieser Reinigungsmethode bei einer Ausbeute von 72 % eine 18fache Anreicherung der spezifischen Aktivität der Vinorin-Synthase im Rohextrakt auf 3.9 pkat/mg erzielt werden konnte. Die Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q stellt somit einen sehr effektiven Reinigungsschritt für die Reinigung dieses Enzyms dar.

Für sämtliche durchgeführten Reinigungsschemata diene deshalb die Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q als erster säulenchromatographischer Reinigungsschritt.

2.2.2 Hydrophobe Interaktionen Chromatographie (HIC) an SOURCE 15PHE

Ebenso wie das Anionenaustauschermaterial SOURCE 30Q zeichnet sich auf Grund der monodispersen Eigenschaften der SOURCE-Materialien auch das verwendete Material für die Hydrophobe Interaktionen Chromatographie (HIC) SOURCE 15PHE durch seine guten Flußeigenschaften sowie eine hohe Bindungskapazität aus. Deshalb eignet sich auch dieses Material für die Trennung großer Proteinmengen und damit für den Einsatz zu einem frühen Stadium der Reinigung.

Die nach der Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q erhaltenen vereinigten aktiven Fraktionen konnten ohne zusätzliche Dialyse für die HIC eingesetzt werden.

Zur Vorbereitung auf diesen chromatographischen Reinigungsschritt wurde lediglich Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 1 M zur Proteinlösung gegeben. Anschließend erfolgte der Auftrag der Proteinlösung auf die Säule über die Systempumpe.

Unter den angewandten chromatographischen Bedingungen (siehe III.1.4.2) band die Vinorin-Synthase vollständig am Material. Die Elution erfolgte durch einen absteigenden Salzgradienten.

Die Elution der Vinorin-Synthase erfolgte bei einer Ammoniumsulfat-Konzentration von 0.1 M (5 mS/cm) (siehe Abbildung 9).

Da der Trenneffekt bei der HIC vor allem bei der Adsorption und nicht, wie sonst üblich, beim Desorptionsprozeß erzielt wird, wurde versucht, durch Optimierung der Startbedingungen den Anteil an Fremdprotein an dem großen Peak bei ca. 0.2 M Ammoniumsulfat (siehe Abbildung 9) zu verringern. Dies konnte jedoch durch Veränderung der Salzkonzentration des Startpuffers – Variation zwischen 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 und 2.0 M Ammoniumsulfat - sowie der HIC-Matrix – Verwendung des HiTrap HIC Test Kit und RESOURCE HIC Test Kit – nicht verwirklicht werden, vor allem, da unterhalb

von 0.5 M Ammoniumsulfat eine vollständige Bindung der Vinorin-Synthase nicht mehr erreicht wurde.

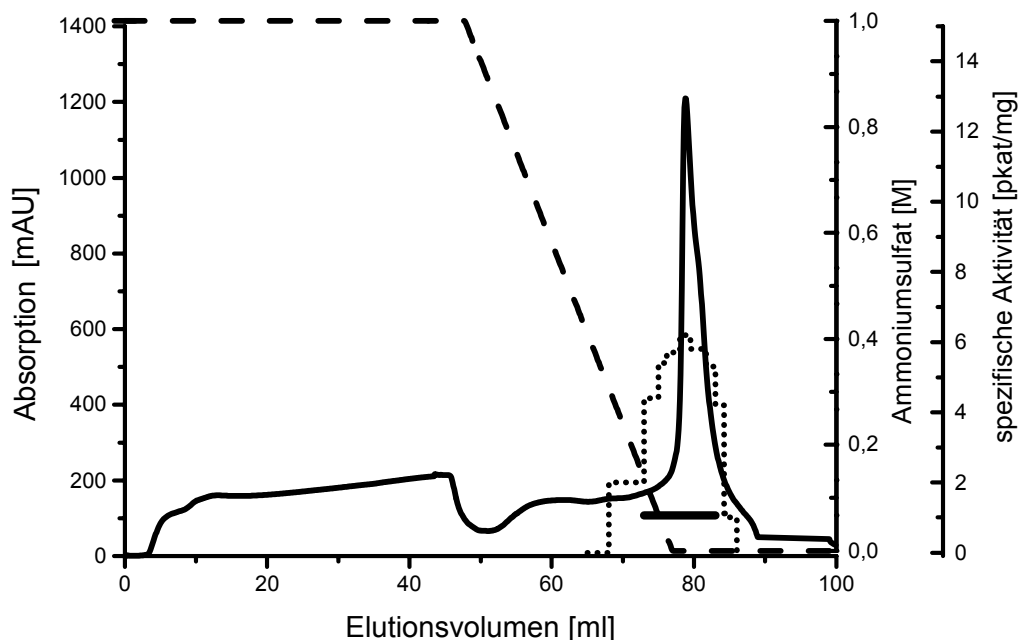


Abbildung 9: Reinigung der Vinorin-Synthase – Elutionsprofil der Hydrophobe Interaktionen Chromatographie (HIC) an SOURCE 15PHE

- UV-Absorption ($\lambda=280$ nm)
- - - Ammoniumsulfat-Gradient
- Spezifische Aktivität [pkat/mg]

Die mit einem Balken gekennzeichneten Fraktionen wurden für die weitere Reinigung verwendet.

Mit Hilfe der Hydrophobe Interaktionen Chromatographie (HIC) an SOURCE 15PHE konnte auch nach Optimierung lediglich eine 1.3fache Anreicherung der spezifischen Aktivität der Vinorin-Synthase im Vergleich zur vorhergehenden Säule erfolgen. Dies liegt vor allem daran, daß das Material irreversible Aktivitätsverluste bewirkt, so daß die Anreicherung wahrscheinlich höher lag, als das die spezifische Aktivität vermuten ließ.

Auch der gelelektrophoretische Vergleich von Reinigungsschemata mit und ohne Verwendung der SOURCE-15PHE-Säule verdeutlichte, daß durch den Einsatz der SOURCE-15PHE-Säule keine Verringerung der Bandenzahl im interessierenden Bereich erreicht werden konnte und damit keine Abtrennung überlagernder Proteine bzw. eine Erleichterung der Zuordnung der Aktivität der Vinorin-Synthase zu einer Bande.

Vor allem aufgrund der irreversiblen Aktivitätsverluste wurde auf die Verwendung der Hydrophoben Interaktionen Chromatographie im optimierten Reinigungsschema für die Vinorin-Synthase (siehe IV.2.5) verzichtet.

2.2.3 Chromatographie an Macro-PrepCeramic Hydroxyapatite (CHT)

Die Chromatographie an Macro-PrepCeramic Hydroxyapatite (CHT) erfolgte je nach Reinigungsschema entweder nach der Ionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q oder bei Einsatz der HIC-Säule SOURCE 15PHE im Anschluß an diese.

Ein Nachteil von Hydroxyapatit ist normalerweise die mechanische und chemische Instabilität. Das eingesetzte Material Macro-PrepCeramic Hydroxyapatit (CHT) ist eine spherische, makroporöse Form des Hydroxyapatits und behebt damit die Limitierungen des traditionellen kristallinen Hydroxyapatits. Das keramische Hydroxyapatit behält dabei die Trenneigenschaften des kristallinen und kann unter konstanten Eigenschaften für eine Vielzahl von Reinigungen bei hohen Flußraten und in großen Säulen eingesetzt werden.

Das für die Chromatographien verwendete Type I-Material zeichnet sich vor allem durch eine höhere Bindungskapazität und eine höhere Kapazität für saure Proteine im Vergleich zum Type II-Material aus, daß besonders für eine bessere Auflösung schnell eluierender Proteine geeignet ist.

Vor der Chromatographie an Hydroxyapatit wurde die Proteinlösung über Nacht gegen Startpuffer dialysiert (siehe III.1.2.1), über die Systempumpe auf die Säule aufgetragen und nicht gebundene Proteine ausgewaschen. Die

Elution gebundener Proteine erfolgte mit einem steigenden KPi-Gradienten (10 – 400 mM) (siehe III.1.4.3).

Die Aktivität der Vinorin-Synthase eluierte über 9 Fraktionen und einen Konzentrationsbereich von 50 – 75 mM KPi (4.5 – 6.5 mS/cm), das Aktivitätsmaximum lag bei 65 mM KPi (5.8 mS/cm) (siehe Abbildung 10). Die Fraktionen mit einer spezifischen Aktivität über 20 pkat/ml wurden vereinigt und gegen den Startpuffer der nächsten Säule dialysiert.

Die Chromatographie an CHT führte bei einer 28 %igen Ausbeute zu einer 8.6fachen Steigerung der nach der vorhergehenden Säule vorhandenen spezifischen Aktivität.

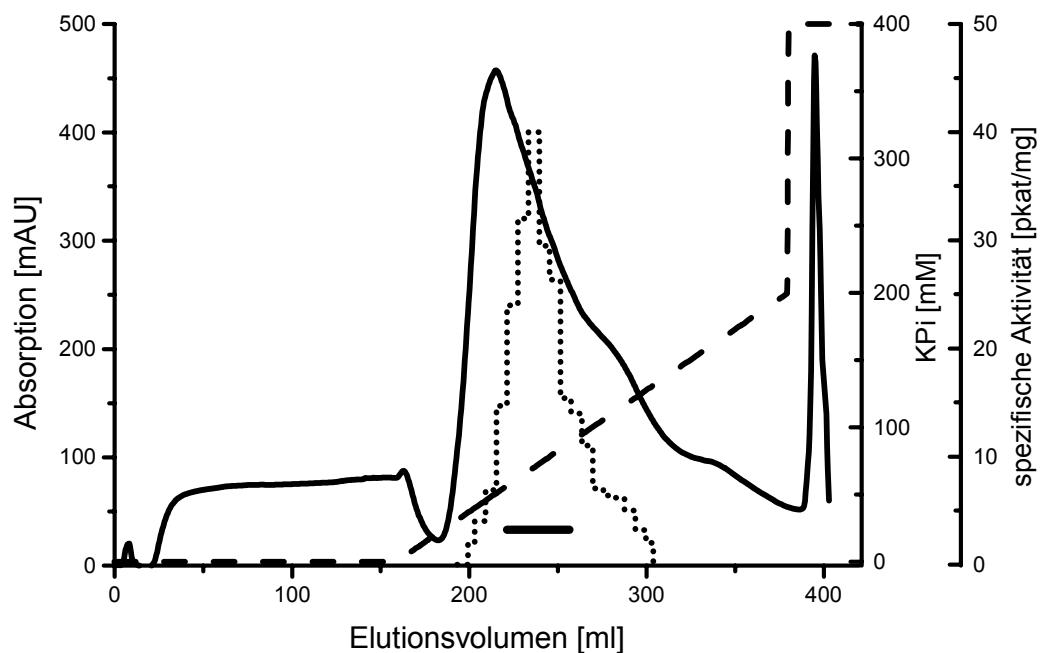


Abbildung 10: Reinigung der Vinorin-Synthase – Elutionsprofil der Chromatographie an Macro-PrepCeramic Hydroxyapatite (CHT)

- UV-Absorption ($\lambda=280$ nm)
- - - Kaliumphosphat-Gradient
- Spezifische Aktivität [pkat/mg]

Die mit einem Balken gekennzeichneten Fraktionen wurden für die weitere Reinigung verwendet.

2.2.4 Chromatofokussierung an Mono P

Bei der Chromatofokussierung erfolgt die Trennung der Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen isoelektrischen Punkte. Bei dieser Technik der Chromatographie wird eine hohe Trennschärfe durch Kombination der Trennmethoden auf der Basis der isoelektrischen Punkte mit der hohen Kapazität eines Ionenaustauschers erhalten. So können pI-Differenzen von 0.02 pH-Einheiten getrennt werden. Weiterhin zeichnet sich die Methode durch einen konzentrierenden Effekt aus.

Die nach der Chromatographie an CHT oder Mono Q erhaltenen aktiven Fraktionen wurden vor der Chromatofokussierung an Mono P über Nacht gegen Startpuffer dialysiert. Nach Auftragen der Proteinlösung über die Systempumpe, Nachspülen mit Startpuffer erfolgte die Elution durch einen pH-Gradienten (siehe III.1.4.4).

Wie in Abbildung 11 ersichtlich, eluierte die Vinorin-Synthase über den pH-Bereich 4.25 – 4.35. Das Maximum der spezifischen Aktivität mit 80.0 pkat/mg konnte bei pH 4.3 detektiert werden.

Nach der Chromatofokussierung an Mono P wurden die entsprechenden Fraktionen einer elektrophoretischen Reinheitskontrolle unterzogen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in IV.3.3 dargestellt.

Falls sich eine weitere chromatographische Reinigung anschloß, wurden die Fraktionen mit einer spezifischen Aktivität über 30 pkat/mg vereinigt und gegen den entsprechenden Startpuffer der nächsten Säule über Nacht dialysiert.

Mit Hilfe der Chromatofokussierung an Mono P konnte durchschnittlich eine 1.6fache Anreicherung der spezifischen Aktivität der Vinorin-Synthase im Vergleich zur vorangegangenen Säule erreicht werden.

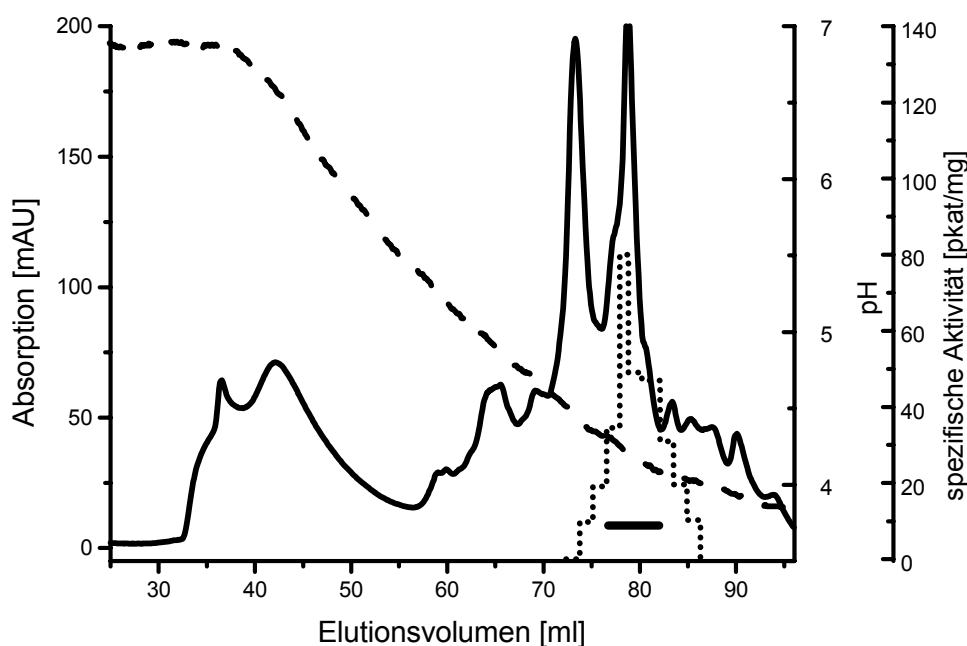


Abbildung 11: Reinigung der Vinorin-Synthase – Elutionsprofil der Chromatofokussierung an Mono P

- UV-Absorption ($\lambda=280$ nm)
- - - pH-Wert
- Spezifische Aktivität (pkat/mg)

Die mit einem Balken gekennzeichneten Fraktionen wurden für die weitere Reinigung verwendet.

2.2.5 Anionenaustauschchromatographie an Mono Q

Für eine zweite Anionenaustauschchromatographie wurde eine Mono-Q-Fertigsäule verwendet. Dieses Material trägt, wie schon das für den ersten chromatographischen Reinigungsschritt eingesetzte SOURCE-Material, die gleiche funktionelle Gruppe (Q) (siehe III.1.4.1.1). Das Mono-Q-Material besitzt eine geringere Porengröße von 10 μm im Vergleich zum SOURCE-Material (30 μm) und perfekt spherische, monodisperse Partikel, die ferner optimal gepackt sind, wodurch eine Leistungsfähigkeit von ca. 25.000 Böden

pro Meter erreicht wird. Die hohe Effizienz des Materials, gekoppelt mit der Selektivität der funktionellen Gruppe Q, führt dazu, daß sich diese Säule vor allem durch eine hohe Auflösung auszeichnet. Wegen ihrer geringen Proteinbindungskapazität wurde die Mono-Q-Säule vor allem am Ende eines Reinigungsschemas zur „Feinreinigung“ eingesetzt.

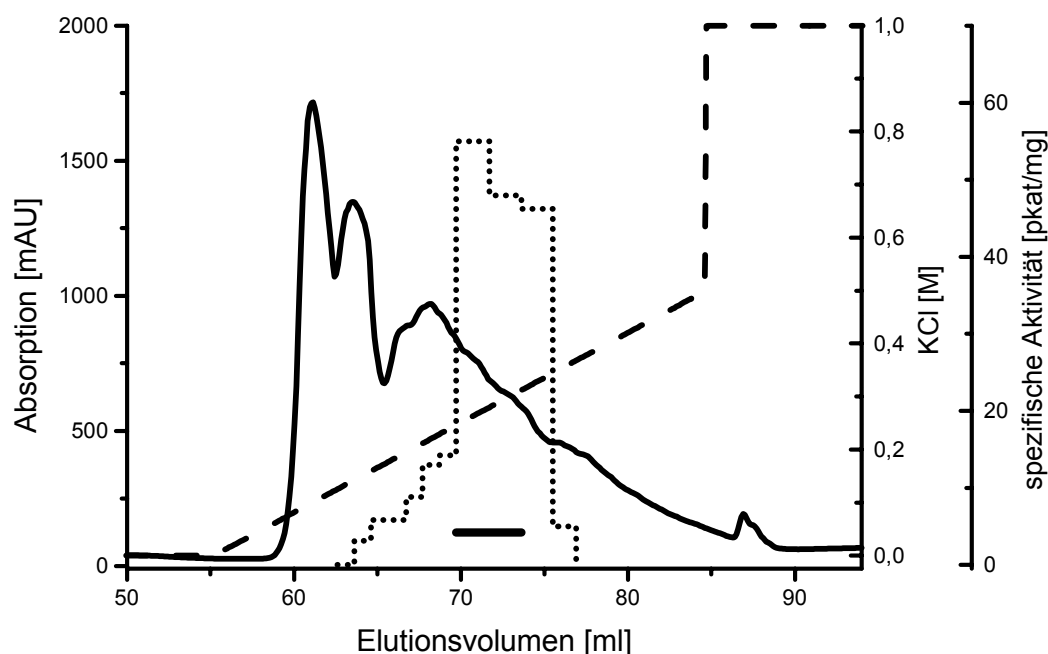


Abbildung 12: Reinigung der Vinorin-Synthase – Elutionsprofil der Chromatographie an Mono Q

- UV-Absorption [$\lambda=280$ nm]
- - - KCl-Gradient
- Spezifische Aktivität [pkat/mg]

Die mit einem Balken gekennzeichneten Fraktionen wurden für die weitere Reinigung verwendet.

Die aktiven Fraktionen mit einer Aktivität über 40 pkat/ml wurden entweder vereinigt und für die weitere chromatographische Reinigung (siehe III.1.4.1.2) genutzt, oder die einzelnen Fraktionen wurden für eine gelelektrophoretische Reinheitskontrolle verwendet (siehe IV.2.3).

Mit Hilfe der Anionenaustauschchromatographie an Mono Q konnte bei einer Ausbeute von 10 % eine 1.4fache Anreicherung der vor der Säule vorhandenen spezifischen Aktivität erreicht werden.

Die für eine weitere Reinigung vorgesehenen Fraktionen wurden – i.a. nach der Chromatographie an CHT oder Mono P - nach Dialyse gegen Startpuffer über die Systempumpe auf die Fertigsäule für die Ionenaustauschchromatographie an Mono Q aufgetragen und nicht gebundene Proteine ausgewaschen. Die Elution erfolgte durch einen KCl-Gradienten über einen Konzentrationsbereich von 0 – 0.5 M, wobei die Elution der Vinorin-Synthase-Aktivität im Bereich einer KCl-Konzentration von 0.25 – 0.3 M (14.5 – 20.0 mS/cm), mit einem Maximum der spezifischen Aktivität bei 0.28 M KCl (17.0 mS/cm) zu finden war (siehe Abbildung 12).

2.2.6 Größenausschlußchromatographie an Superdex 75

Die Größenausschlußchromatographie an Superdex 75 wurde für die Bestimmung des Molekulargewichts der Vinorin-Synthase eingesetzt (siehe III.3.3). Als Reinigungsschritt im optimierten Reinigungsprotokoll zur Reinigung der Vinorin-Synthase kam sie dagegen nicht zum Einsatz.

Da der Trenneffekt bei der Ausschlußchromatographie nur in geringem Maße von den variierbaren chromatographischen Bedingungen, sondern im wesentlichen von der Gelstruktur des Säulenmaterials abhängt, wurde mit dem Material Superdex 75 ein Material eingesetzt, das mit dem Trennbereich für globuläre Proteine der Größe 3000 – 70.000 Da auf jeden Fall den für die Vinorin-Synthase-Größe abdeckt.

Für die Chromatographie an Superdex 75 wurden die eingesetzten Fraktionen zunächst mit Hilfe von Microcon-10 Einwegkonzentratoren auf ein Volumen von ca. 50 µl eingengt. Nach Äquilibration der Säule mit Startpuffer wurde

die Probe über die 2-ml-Probenschleife des Injektionsventils auf die Säule aufgetragen. Anschließend erfolgte die Trennung (siehe III.1.4.5).

Das Maximum der Aktivität der Vinorin-Synthase eluierte nach 10.75 ml über einen Bereich von 10.25 – 11.25 ml (siehe Abbildung 13).

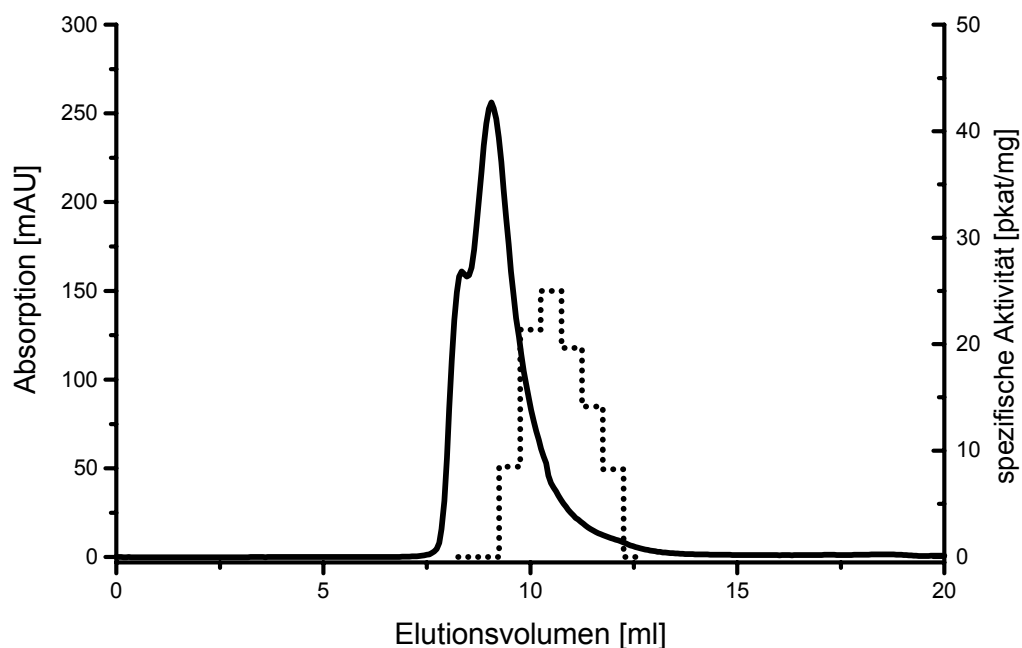


Abbildung 13: Reinigung der Vinorin-Synthase – Elutionsprofil der Chromatographie an Superdex 75

— UV-Absorption ($\lambda=280$ nm)
..... Spezifische Aktivität [pkat/mg]

Die sich anschließende gelelektrophoretische Reinheitskontrolle zeigte, daß sich mit Hilfe der Größenausschlußchromatographie nur Banden über 67 kD und unter 25 kD von der Vinorin-Synthase abtrennen lassen. Da dies keine weitere Eingrenzung bei der Identifizierung der Vinorin-Synthase im SDS-Gel bedeutete, wurde diese Säule nicht Bestandteil des optimierten Reinigungsprotokolls (siehe IV.2.5).

2.2.7 Weitere getestete Chromatographiematerialien

Die im folgenden beschriebenen Chromatographiemethoden Kationenaustauschchromatographie sowie Affinitätschromatographie an Coenzym-A-Agarose wurden lediglich auf ihre Einsatzmöglichkeit getestet, erwiesen sich jedoch für den Einsatz in einem Reinigungsschema als ungeeignet.

2.2.7.1 Kationenaustauschchromatographie

Wie in III.1.4.6.1 beschrieben, wurde, um die Möglichkeit einer Kationenaustauschchromatographie zu testen, die Stabilität des Enzyms bei dem benötigten pH-Wert von 2.5 untersucht.

Nach 20 min bei pH 2.5 konnte keine Vinorin-Synthase-Aktivität mehr detektiert werden, so daß eine Kationenaustauschchromatographie nicht genutzt werden konnte.

2.2.7.2 Affinitätschromatographie an Coenzym-A-Agarose

Nach der Affinitätschromatographie an Coenzym-A-Agarose (siehe III.1.4.6.2) wurde ein Enzymaktivitätstest durchgeführt (siehe III.2.1). Während der Durchlauf der Säule eine im Vergleich zum Auftrag kaum verringerte Aktivität zeigte, ließ sich Vinorin-Synthase-Aktivität im Eluat nicht nachweisen.

Die Aktivitätsverminderung zwischen Durchlauf und Auftrag läßt sich vollständig durch die Volumenzunahme erklären, so daß davon ausgegangen werden muß, daß die Vinorin-Synthase keine Affinität zur Coenzym-A-Agarose besitzt, weshalb dieses Material nicht für die Reinigung eingesetzt wurde.

2.3 Untersuchungen zur Identifizierung der Vinorin-Synthase in SDS-Gelen

Zur Identifizierung der Vinorin-Synthase in einem SDS-Gel nach säulenchromatographischer Reinigung wurde zunächst ein Übersichtsgel angereicherter Proteinfractionen (IV.2.3.1) angefertigt. Weiterhin wurde versucht mit der Methode der Kombination von BNE und SDS-PAGE (IV.2.3.2) sowie dem Test verschiedener Zelllinien auf Vinorin-Synthase-Aktivität (IV.2.3.3), eine Bande im SDS-Gel der Vinorin-Synthase zuzuordnen.

2.3.1 Gelelektrophoretische Reinheitskontrolle

Die nach einer Reinigung erhaltenen Proteinlösungen wurden zur Überprüfung des Reinigungserfolgs zunächst mittels SDS-Gelelektrophorese (siehe III.1.5.1) getrennt und die Proteinbanden mit Coomassie- (siehe III.1.5.4.1) oder Silberfärbung (siehe III.1.5.4.2.) sichtbar gemacht.

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden die nach dem optimierten Reinigungsprotokoll (siehe IV.2.5) erhaltenen Fraktionen der Mono-P-Säule eingesetzt. Zur Probenvorbereitung wurden je 50 µl der Proteinlösungen mit 50 µl Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95 °C erhitzt (siehe III.1.5.1). Die elektrophoretische Trennung erfolgte bei einer Stromstärke von 15 – 16 mA (2 Gele) über ca. 16 h in einem 11 %igen SDS-Gel.

Das so erhaltene SDS-Gel (siehe Abbildung 14) zeigte eine Reihe von Banden, auch im für die Vinorin-Synthase erwarteten Molekulargewichtsbereich von 30 – 50 kD, so daß eine eindeutige Zuordnung der Vinorin-Synthase zu einer dieser Banden nicht möglich war.

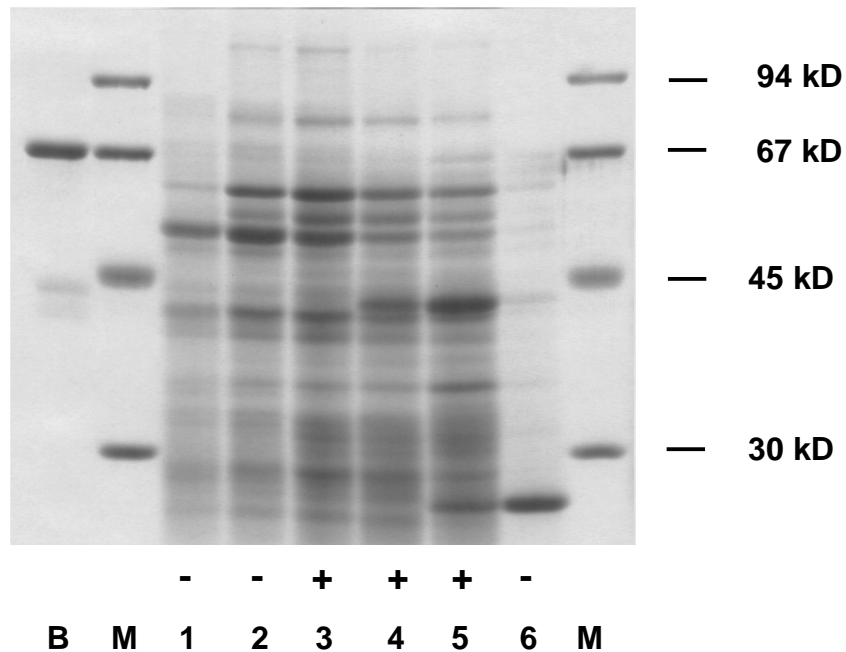


Abbildung 14: SDS-Gel der angereicherten Proteinfractionen

Die Reinigung erfolgte nach dem in Tabelle 12 beschriebenen Reinigungsprotokoll. Aufgetragen wurden jeweils 50 µl der nach Mono P erhaltenen Fraktionen.

- B** BSA (10 µg)
- M** Markerproteine
- +** Vinorin-Synthase-Aktivität
- keine Vinorin-Synthase-Aktivität

2.3.2 Kombination von BNE und SDS-PAGE zur Identifizierung der Vinorin-Synthase

Da eine Reinigung der Vinorin-Synthase zur Homogenität nicht möglich war, wurde eine Methode eingesetzt, bei der BNE und SDS-PAGE miteinander kombiniert werden. Ziel der Kombination ist es, mit Hilfe von Gelbereichen der BNE, die Enzymaktivität aufweisen, in der zweiten Dimension die Vinorin-Synthase im SDS-Gel einer Proteinbande zuordnen zu können.

Durch die Bedingungen bei der BNE bleiben Enzymaktivitäten in vielen Fällen erhalten.

Aufgrund der Bestimmung der relativen Molekülgröße der Vinorin-Synthase mittels kalibrierter Säulen (siehe IV.3) mit 45 kD sollte auch im SDS-Gel nahe dieser Molekülgröße die Bande auftreten, die der Vinorin-Synthase entspricht.

2.3.2.1 Basische Nativgelelektrophorese (1. Dimension)

Für die Untersuchungen wurden Mono-P-Fractionen verwendet, die durch das Reinigungsschema erhalten wurden, mit dem auch der Vergleich der verschiedenen Zelllinien durchgeführt wurde (siehe IV.2.3.3).

Für die Trennung in der ersten Dimension (Nativgel) wurde jeweils eine aktive Fraktion verwendet. Zur Vorbereitung wurde diese mittels Microcon-10 Einwegkonzentratoren (siehe III.1.2.3) konzentriert und je 17 µl der so erhaltenen Lösung in die Auftragesaschen des Gels gegeben.

Nach der Elektrophorese (siehe III.1.5.2) wurde das Gel senkrecht zur Trennrichtung zerschnitten. Die beiden äußeren Bahnen wurden einer Coomassie-Färbung (siehe III.1.5.4.1) unterzogen. So konnte überprüft werden, ob das Laufverhalten des Gels gleichmäßig war. Die restlichen Querstreifen wurden halbiert und jeweils 4 Bahnen mit einem Enzymaktivitätstest auf das Vorliegen von Vinorin-Synthase untersucht (siehe III.2.3).

Eine graphische Darstellung der Auftragsreihenfolge, sowie eine Kennzeichnung der weiteren Bearbeitung der Gelstücke gibt Abbildung 15.

Die Untersuchung der Gelfragmente der einzelnen Querstreifen führte zu einer Ermittlung der Aktivität in den Streifen 12 - 16 mit einem Aktivitätsmaximum in Streifen 14 (siehe Abbildung 15)

Nach dem Aktivitätstest konnte das für diese Untersuchung nicht benötigte Pellet nach Behandlung mit SDS-Probenpuffer (50 µl, 5 min bei 95 °C; siehe III.1.5.3) direkt für die SDS-PAGE (siehe IV.2.3.2.2) eingesetzt werden.

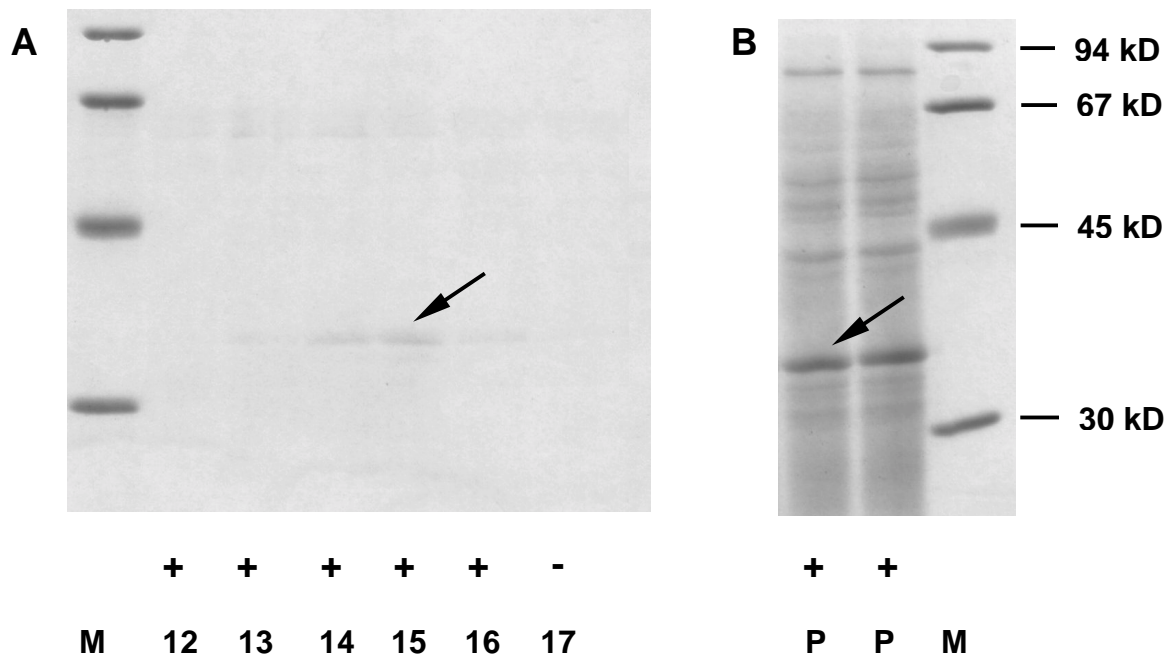


Abbildung 16: SDS-Gel (2. Dimension) nach BNE (1. Dimension) zur Identifizierung der Vinorin-Synthase

Die Reinigung erfolgte nach dem in Tabelle 10 beschriebenen Reinigungsprotokoll.

- M** Markerproteine
- +** Vinorin-Synthase-Aktivität
- keine Vinorin-Synthase-Aktivität

- A 12-17** Nach BNE auf Vinorin-Synthase-Aktivität untersuchte Gelfragmente (Nummern entsprechen der Zahl des Querstreifens der BNE).
Streifen 12-16 zeigen Vinorin-Synthase-Aktivität, Maximum der Aktivität in Streifen 14. Streifen 17 zeigt keine Vinorin-Synthase-Aktivität.
- B P** Für BNE eingesetzte gereinigte Mono-P-Fraktion.
Die mit einem Pfeil markierte Bande wurde für die Bestimmung von Peptidsequenzen eingesetzt.

Auch unter Beachtung des Enzymaktivitätsverlaufs entspricht das Maximum der Stärke der deutlichen Bande bei 35 kD dem Maximum der in den Gelstücken ermittelten Aktivität (Bahn 14). Da die Größenbestimmung von PFITZNER et al.^[66] mit 30.5 kD \pm 10 % weit von dem in dieser Arbeit ermittelten

Wert von $43 \text{ kD} \pm 3 \%$ (siehe IV.3) entfernt liegt, ist nicht auszuschließen, daß die Vinorin-Synthase eine tatsächliche Größe von 35 kD besitzt, so daß eine Sequenzierung der Bande, die in diesem Bereich gefunden wurde, sinnvoll erscheint.

Die nach dem Nativgel (1. Dimension) auf das SDS-Gel (2. Dimension) aufgetragenen Proteinmengen sind sehr gering. Aus diesem Grund wurde mit der Proteinlösung, mit der auch die 1. Dimension angefertigt worden war, direkt ein SDS-Gel angefertigt. Durch Vergleich der Gele wurde die Bande zugeordnet, die durch das SDS-Gel der 2. Dimension als mögliche Bande der Vinorin-Synthase identifiziert worden war.

2.3.2.3 Proteolytische Spaltung und Bestimmung von Peptidsequenzen

Die durch die Kombination von BNE und SDS-PAGE ermittelte mögliche Bande der Vinorin-Synthase (siehe Abbildung 16B, mit Pfeil markierte Bande) wurde zur Bestimmung interner Aminosäuresequenzen mit der Endoproteinase LysC gespalten.

Der Verdau erfolgte, wie von CLEVELAND et al.^[86] beschrieben, direkt im Gel. Dazu wurde die entsprechende Bande mit einem Skalpell ausgeschnitten, wodurch die noch auf dem Gel sichtbaren, benachbarten Proteine (siehe Abbildung 16B) abgetrennt wurden. Die durch den Verdau erhaltenen Proteine wurden eluiert und HPLC-chromatographisch getrennt und fraktioniert. Die Sequenzierung einzelner Peptidfraktionen führte zu den in Tabelle 8 angegebenen Aminosäuresequenzen*.

* Die Durchführung der proteolytischen Spaltung und die Bestimmung der Peptidsequenzen erfolgte am Max-Planck-Institut in Martinsried.

Tabelle 8: Ermittelte Aminosäuresequenzen von Oligopeptiden, erhalten nach Verdau der Bande, die als Vinorin-Synthase angesehen wurde.

Peptidfragment- Nummer	Aminosäurelänge	Aminosäuresequenz
1	10	HSEFISYPIS
2	10	LDAQPELFIH
3	9	EVSHEGSLV

2.3.2.4 Homologievergleich der Peptide

Durch Vergleich der ermittelten Peptidsequenzen mit bereits ermittelten und in Datenbanken erfaßten Proteinsequenzen lassen sich Homologien zu bestimmten Proteinfamilien feststellen. Die Datenbankrecherche erfolgte in der *SwissProt*-Datenbank unter Verwendung des FASTA-Sequenzanalyseprogramms.

Der Vergleich der ermittelten Peptidssequenzen (siehe Tabelle 8) mit in der Datenbank *SwissProt* hinterlegten Sequenzen zeigte hohe Homologien für alle 3 Peptide zu den entsprechenden Bereichen von aus *Arabidopsis thaliana* (HS 82)^[87], *Oryza sativa* (HS 82)^[88], *Pharbitis nil* (HS 83)^[89] und *Zea mays* (HS 82)^[90] isolierten Hitzeschockproteinen. Wegen ihres Molekulargewichts gehören alle diese Hitzeschockproteine zur Hitzeschockprotein-Familie HSP 90. Für das Hitzeschockprotein aus *Oryza sativa* konnten für alle 3 Peptide Homologien >85 % festgestellt werden (siehe Tabelle 9).

Aufgrund der hohen Homologie der 3 sequenzierten Peptide zu Hitzeschockproteinen kann davon ausgegangen werden, daß es sich bei der sequenzierten Bande um die Bande eines aus *Rauvolfia-serpentina*-Zellkulturen isolierten Hitzeschockproteins handelt.

Tabelle 9: Ergebnisse des Homologievergleichs der durch proteolytische Spaltung der als Vinorin-Synthase identifizierten Bande erhaltenen Peptide mit in der Datenbank SwissProt hinterlegten Sequenzen

Sequenzvergleich für **Peptid 1**

Enzym	Peptidsequenz		Identität	
			absolut	%
		HSEFISYPIS		
HS82 ARATH	198	HSEFISYPIS 207	10/10	100
HS82 ORYSA	199	HSEFISYPIS 208	10/10	100
HS83 PHANI	203	HSEFISYPIY 211	9/10	90
HS82 MAIZE	209	HSEFISYPIY 217	9/10	90

Sequenzvergleich für **Peptid 2**

Enzym	Peptidsequenz		Identität	
			absolut	%
		LDAQPELFIH		
HS82 ARATH	57	LDGQPELFIH 66	9/10	90
HS82 ORYSA	58	LDAQPELFIH 67	10/10	100
HS83 PHANI	62	LDAQPELFIH 71	9/10	90
HS82 MAIZE	68	VNAQPELFIH 67	7/10	70

Sequenzvergleich für **Peptid 3**

Enzym	Peptidsequenz		Identität		
		EVSHEGSLV	absolut	%	
HS82 ARATH	253	EVSHEWDLV	251	7/9	78
HS82 ORYSA	255	EVSHEWSLV	263	8/9	88
HS83 PHANI	258	EVSHEWQLIN	256	5/9	56
POL2 GFLV	607	VVSPEGSLV	616	7/9	78

Die Nummer des Peptidfragments entspricht der in Tabelle 8 verwendeten.

Beispiele von verglichenen Enzymsequenzen:

- HS82 ARATH:** Hitzeschockprotein 81-2 aus *Arabidopsis thaliana*^[87]
- HS82 ORYSA:** Hitzeschockprotein 82 aus *Oryza sativa*^[88]
- HS83 PHANI:** Hitzeschockprotein 83 aus *Pharbitis nil*^[89]
- HS82 MAIZE:** Hitzeschockprotein 82 aus *Zea mays* (Maize)^[90]
- POL2 GFLV:** RNA2 Polyprotein^[91]

verwendete Abkürzungen:

- HS Hitzeschockprotein
- Zahlenwert Molekulargewicht des Proteins in kD

Übereinstimmende Aminosäuren sind **unterlegt** dargestellt.

2.3.3 Test verschiedener Zelllinien auf Vinorin-Synthase-Aktivität

Da auch nach Optimierung des Reinigungsschemas und auch durch die Methode der Kombination von SDS-PAGE und BNE keine eindeutige Zuordnung der Aktivität der Vinorin-Synthase zu einer Bande in einem SDS-Gel möglich war bzw. die vermutete Bande nicht der Vinorin-Synthase entsprach, wurde die Reinigung an verschiedenen Zelllinien, die Vinorin-Synthase-Aktivität zeigen, wiederholt.

In unterschiedlichen Zelllinien sind bestimmte Proteine qualitativ und quantitativ unterschiedlich stark exprimiert. Geht man davon aus, daß aus allen Zelllinien hochaufgereinigte Fraktionen mit Vinorin-Synthase-Aktivität erhalten werden können, so müssen diese Fraktionen im SDS-Gel auch die entsprechenden Banden zeigen. Andererseits können einige Banden in den Gelen ausgeschlossen werden, da sie nicht in jeder Zelllinie nachzuweisen sind, so daß durch negativen Ausschluß die im SDS-Gel in Frage kommenden Banden eventuell deutlich reduziert werden können.

Die für den Vergleich der Zelllinien eingesetzten Proteinlösungen wurden durch das in Tabelle 10 dargestellte Reinigungsschema erhalten. Für die Testaufschlüsse wurden je 3.5 kg Zellkulturgewebe von *Rauvolfia serpentina* der Linien „T30“ und „München“ sowie der Hybridzellkultur *Rauvolfia serpentina* × *Rhazya stricta* eingesetzt.

Die nach der chromatographischen Reinigung erhaltenen Fraktionen, die Vinorin-Synthase-Aktivität zeigten, wurden mit Hilfe von Microcon-10-Einwegkonzentratoren (siehe III.1.2.3) eingeeengt und anschließend einer geoelektrophoretischen Reinheitskontrolle unterzogen (siehe Abbildung 17).

Tabelle 10: Reinigungsschema für das Testen verschiedener Zelllinien

	Reinigungsschritt	Vorbereitung auf nächsten Reinigungsschritt
a.	Herstellung eines Proteinrohextraktes aus 3.5 kg tiefgefrorenem Zellkulturgewebe (siehe III.1.1)	
b.	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (30 - 70 %) (siehe III.1.1)	Dialyse gegen 10 mM Tris/HCl, pH 7.8, 10 mM MSH
c.	Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q (siehe III.1.4.1.1)	Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 1 mol/l
d.	Hydrophobe Interaktionen Chromatographie an SOURCE 15PHE (siehe III.1.4.2)	Dialyse gegen 10 mM KPi, pH 7.0, 10 mM MSH
e.	Chromatographie an MacroPrep Ceramic Hydroxyapatite – CHT (siehe III.1.4.3)	Dialyse gegen 25 mM Bis-Tris, pH 6.8, 10 mM MSH
f.	Chromatofokussierung an Mono P (siehe III.1.4.4)	

Für den gelektrophoretischen Vergleich der Zelllinien wurden Proteinlösungen mit ähnlich hohen Aktivitäten genutzt, so daß die Bande die der Vinorin-Synthase zugeordnet werden könnte im SDS-Gel der einzelnen Zelllinien ähnlich stark erscheinen sollte. Legt man dies zugrunde, so lassen sich alle deutlichen Banden im Bereich zwischen 30 - 50 kD der einzelnen Zelllinien ausschließen, da sie in den jeweils anderen Zelllinien gar nicht oder nur viel schwächer auftreten.

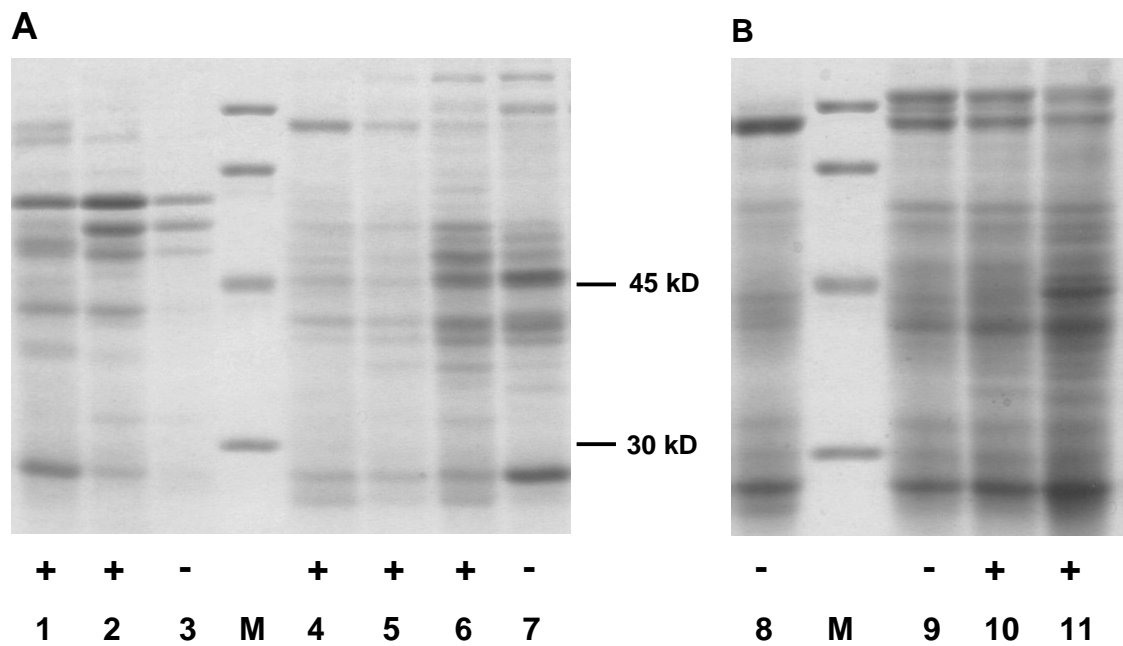


Abbildung 17: SDS-Gel nach Reinigungsprotokoll zum Vergleich verschiedener Zelllinien

Die Reinigung erfolgte nach dem in Tabelle 10 beschriebenen Reinigungsprotokoll. Aufgetragen wurden nach Konzentrierung jeweils 500 μ l der nach Mono P erhaltenen Fraktionen.

- M** Markerproteine
- +** Vinorin-Synthase-Aktivität
- keine Vinorin-Synthase-Aktivität

A 1-3 Fraktionen erhalten aus Zellkulturgewebe des Hybrids *Rauvolfia serpentina* \times *Rhazya stricta* (**R** \times **R**)

4-7 Fraktionen erhalten aus *Rauvolfia-serpentina*-Zellkulturgewebe der Linie **München**

B 8-11 Fraktionen erhalten aus *Rauvolfia-serpentina*-Zellkulturgewebe der Linie **T 30**

So ermöglichte auch der Vergleich von Vinorin-Synthase-aktiven Fraktionen verschiedener Zelllinien, die mit Hilfe des gleichen Reinigungsschemas erhalten wurden, keine Zuordnung einer Bande im Bereich zwischen 30 - 50 kD zur Bande der Vinorin-Synthase.

2.4 Kurzreinigungsschema zur Bestimmung des Molekulargewichts mittels Größenausschlußchromatographie an Superdex 75

Für die Bestimmung des Molekulargewichts mittels Größenausschlußchromatographie wurde das in Tabelle 11 dargestellte Reinigungsschema verwendet.

Die Ergebnisse der Molekulargewichtsbestimmung sind in IV.3 dargestellt.

Tabelle 11: Kurzreinigungsschema zur Bestimmung des Molekulargewichts

	Reinigungsschritt	Vorbereitung auf nächsten Reinigungsschritt
a.	Herstellung eines Proteinrohextraktes aus bis zu 10 kg tiefgefrorenem Zellkulturgewebe von <i>Rauvolfia serpentina</i> (siehe III.1.1)	
b.	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (30 - 70 %) (siehe III.1.1)	Dialyse gegen 10 mM Tris/HCl, pH 7.8, 10 mM MSH
c.	Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q (siehe III.1.4.1.1)	Zugabe von Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 1 mol/l
d.	Chromatographie an MacroPrep Ceramic Hydroxyapatite – CHT (siehe III.1.4.3)	Konzentrierung mit Hilfe von Microcon-10 Einwegkonzentratoren
e.	Größenausschlußchromatographie an Superdex 75 (siehe III.1.4.5)	

Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse der Größenbestimmung mittels Größenausschlußchromatographie mit denen der Größenbestimmung im SDS-Gel übereinstimmen, wurde der aktiven Probe, die auf die Säule aufgetragen wurde, das auch für die Eichung der Größenausschlußsäule verwendete Markerprotein der Größe 45 kD (Ovalbumin) zugesetzt. Nach der Chromatographie wurde die Aktivität in den Fraktionen bestimmt und die aktiven Fraktionen gelelektrophoretisch untersucht (siehe Abbildung 18).

Wie Abbildung 18 zeigt, ist bei 45 kD im SDS-Gel eine starke, sonst nicht sichtbare Bande zu erkennen, die auf das Markerprotein zurückgeführt werden kann. Ferner ist für diese Bande deutlich zu erkennen, wie die Proteinmenge zunächst zunimmt und schließlich wieder abnimmt (Bahnen 1-6). Die Fraktion (Bahn 4), die der stärksten Bande zugeordnet werden kann, entspricht im Elutionsvolumen genau dem erwarteten Wert für ein Protein dieser Größe (siehe IV.3). Dies ist auch zu erwarten, da es sich um ein Protein handelt, mit dem die Säule für die Größenausschlußchromatographie geeicht wurde.

Die sehr genaue Übereinstimmung zwischen Größenbestimmung mittels Ausschlußchromatographie und Bestimmung im SDS-Gel liegt u.a. daran, daß das Markerprotein eine globuläre Struktur aufweist und dadurch in nativer und denaturierter Form eine gleiche effektive Größe zeigt. Bemerkenswert ist aber, daß die chromatographisch ermittelte Zu- und Abnahme im Verlauf der Trennung auch mit bloßem Auge nachvollzogen werden kann. Dies sollte ferner auch bei jedem anderen Protein der Fall sein.

Da die Größe des Markerproteins und die für die Vinorin-Synthase ermittelte native Größe übereinstimmen, ist zu erwarten, daß auf dem SDS-Gel die Bande der Vinorin-Synthase nicht wesentlich von der Bande des Markerproteins entfernt erscheinen wird.

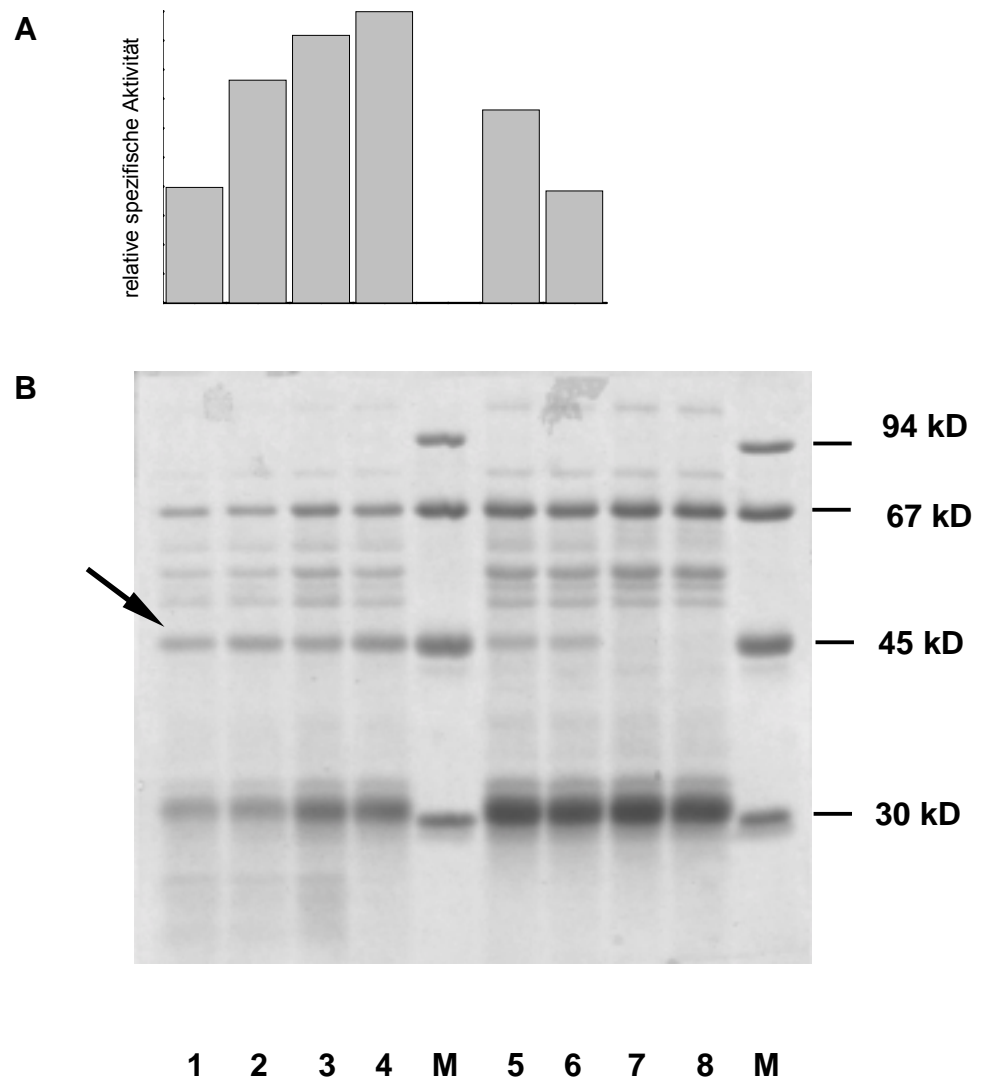


Abbildung 18: SDS-Gel und Enzymaktivitätsverlauf nach Größenausschlußchromatographie

M Markerproteine

A Enzymaktivitätsverlauf

Verlauf der relativen spezifischen Aktivität in den eluierten Fraktionen der Superdex-75-Säule.

B SDS-Gel nach Größenausschlußchromatographie

Die Reinigung erfolgte nach dem in Tabelle 11 beschriebenen Reinigungsprotokoll. Aufgetragen wurden jeweils 50 µl der nach der Superdex 75 erhaltenen Fraktionen.

1-6 Fraktionen mit Markerzusatz (Ovalbumin 45 kD)

7+8 Fraktionen ohne Markerzusatz

Aus der Erfahrung, daß die Veränderung der Proteinmenge im Verlauf der Elution auch im SDS-Gel zu beobachten ist, ist dies auch für die Vinorin-Synthase zu erwarten, d.h. der Verlauf der Bandenstärke sollte qualitativ dem des Markerproteins sowie dem Aktivitätsverlauf der Vinorin-Synthase entsprechen.

Betrachtet man ein SDS-Gel nach Größenausschlußchromatographie einer Fraktion mit Vinorin-Synthase-Aktivität ohne Markerzusatz, so gibt es eine solche Bande zwischen 30 – 50 KD nicht (siehe Abbildung 18, Bahn 7+8).

2.5 Optimiertes, allgemeines Reinigungsschema

Um das Ziel der Ermittlung der Aminosäuresequenz der Vinorin-Synthase zu verwirklichen, ist es notwendig der Vinorin-Synthase eine Bande im SDS-Gel zuzuordnen. Dazu ist es zunächst erforderlich die Vinorin-Synthase zu reinigen, um die Bandenzahl im Gel deutlich zu verringern.

Im Verlaufe dieser Arbeit wurde zu diesem Zweck eine Vielzahl von Reinigungsprotokollen ausgearbeitet. Das im folgenden beschriebene Reinigungsschema stellt ein auf die Vinorin-Synthase optimiertes Reinigungsprotokoll unter der optimalen Verwendung sämtlicher momentan dem Arbeitskreis zugänglicher Chromatographiematerialien dar.

Zu Beginn der Reinigung wurde zunächst der Proteinrohextrakt aus ca. 10 kg *Rauvolfia-serpentina*-Zellkulturgewebe gewonnen (siehe III.1.1). Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand ergab ein Volumen von 10 l mit einem Proteingehalt von ca. 13 g.

Die nach der anschließenden fraktionierten Ammoniumsulfatfällung und Dialyse gegen den Startpuffer der SOURCE-30Q-Säule erhaltene Lösung besaß eine Proteinmenge von ca. 10 g, entsprechend einer Konzentration von 20 mg/ml. Die Gesamtaktivität betrug 2150 pkat, was einer Ausbeute von 76 % entspricht.

Die anschließende vierstufige chromatographische Reinigung mit Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q, Chromatographie an CHT, Anionenaustauschchromatographie an Mono Q und Chromatofokussierung an Mono P resultierte in einer 340fachen Anreicherung der Aktivität der Vinorin-Synthase bei einer Ausbeute von 1.6 % (siehe Tabelle 12). Die Bilanz der Reinigung ist in Tabelle 12 zusammengefasst.

Tabelle 12: Optimiertes Reinigungsschema zur Reinigung der Vinorin-Synthase

	Reinigungsschritt	Vorbereitung auf nächsten Reinigungsschritt
a.	Herstellung eines Proteinrohextraktes aus bis zu 10 kg tiefgefrorenem Zellkulturgewebe von <i>Rauvolfia serpentina</i> (siehe III.1.1)	
b.	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (30 - 70 %) (siehe III.1.1)	Dialyse gegen 10 mM Tris/HCl, pH 7.8, 10 mM MSH
c.	Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q (siehe III.1.4.1.1)	Dialyse gegen 10 mM KPi, pH 7.0, 10 mM MSH
d.	Chromatographie an MacroPrep Ceramic Hydroxyapatite – CHT (siehe III.1.4.3)	Dialyse gegen 10 mM Tris/HCl, pH 7.8, 10 mM MSH
e.	Anionenaustauschchromatographie an Mono Q (siehe III.1.4.1.2.)	Dialyse gegen 25 mM Bis-Tris, pH 6.8, 10 mM MSH
f.	Chromatofokussierung an Mono P (siehe III.1.4.4)	

Tabelle 13: Reinigungsprotokoll zur Anreicherung der Vinorin-Synthese von *Rauvolfia-serpentina*-Zellkulturgewebe

Reinigungsschritt	Volumen [ml]	Proteinmenge [mg]	Protein-konzentration [mg/ml]	Aktivität [pkat]	spez. Aktivität [pkat/mg]	Ausbeute [%]	Anreicherungs-faktor
Rohextrakt	10000	13100	1.3	2830	0.22	100	1
Ammoniumsulfat-fällung	470	9760	20.8	2150	0.22	76	1
SOURCE 30Q	325	525	1.6	2040	3.89	72	18
CHT	27	15	0.6	510	34.0	18	155
Mono Q	7.5	5.5	0.7	255	46.4	9	210
Mono P	1.5	0.6	0.4	45	75.0	1.6	340

3 Bestimmung des Molekulargewichts der Vinorin-Synthase

Die Bestimmung des Molekulargewichts der Vinorin-Synthase erfolgte mit Hilfe der Größenausschlußchromatographie an Superdex 75 (siehe III.1.4.5). Die Eichung der Chromatographiesäule erfolgte mit den löslichen Proteinen Albumin (Rinderserum), Albumin (Hühnerei), Chymotrypsinogen (siehe Abbildung 19).

Die nach dem in IV.2.4 beschriebenen Kurzreinigungsschema erhaltenen aktiven Fraktionen wurden zur Bestimmung des Molekulargewichts der Vinorin-Synthase eingesetzt.

Dem Maximum der Vinorin-Synthase-Aktivität bei einem Elutionsvolumen von 10,5 ml (siehe III.2.2.6) konnte eine relative Molekülmasse von $43 \text{ kD} \pm 3 \%$ zugeordnet werden.

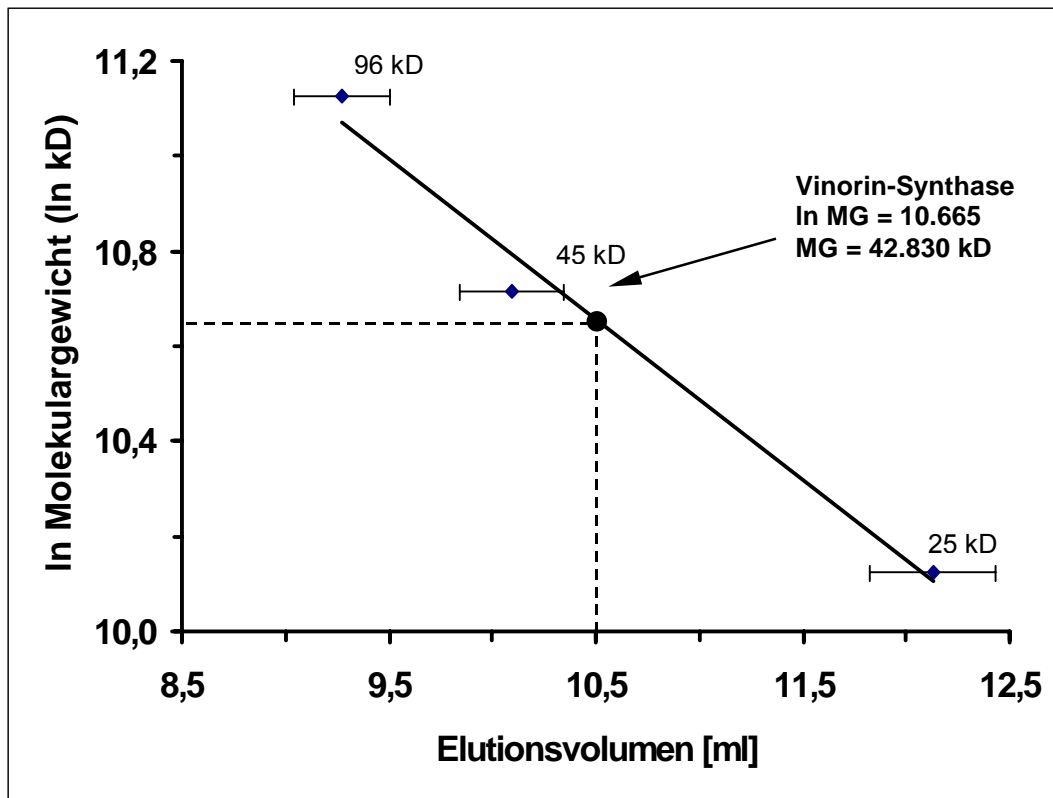


Abbildung 19: Kalibrierungskurve für die Molekulargewichtsbestimmung an Superdex 75

V DISKUSSION

1 Bisherige Forschungsergebnisse zur Vinorin-Synthase

Das Enzym Vinorin-Synthase wurde 1983 erstmals von PFITZNER et al.^[94] beschrieben.

Beim zellfreien Umsatz von 16-epi-Vellosimin, enzymatisch aus Polyneuridinaldehyd (PNA) hergestellt, konnte bei Anwesenheit von Acetyl-Coenzym A die Bildung von Vinorin beobachtet werden. Das an dieser Reaktion beteiligte Enzym wurde als Vinorin-Synthase bezeichnet (siehe Abbildung 20).

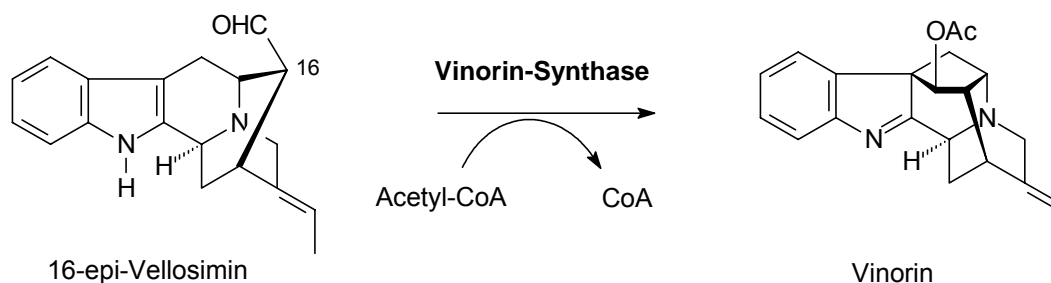


Abbildung 20: Enzymatisch katalysierte Bildung von Vinorin aus 16-epi-Vellosimin

Von PFITZNER et al.^[66] wurde die Vinorin-Synthase erstmals aus *Rauvolfia-serpentina*-Zellsuspensionskulturen angereicht und charakterisiert. Weitere Versuche zur Reinigung wurden von OBITZ^[85] und KÖRNIG^[92] durchgeführt.

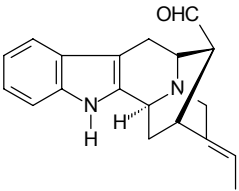
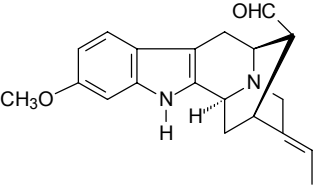
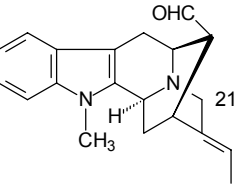
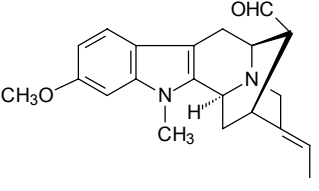
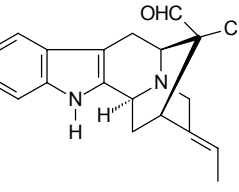
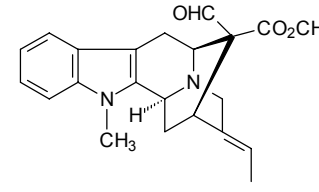
Bei ersten Versuchen zur Charakterisierung der Vinorin-Synthase wurde das Molekulargewicht durch Gelfiltration an einer AcA 54 mit $30.5 \text{ KD} \pm 10 \%$ bestimmt, ferner konnte der isoelektrische Punkt mit Hilfe der Chromatofokussierung nach SLUYTERMAN^[93] ermittelt werden. Die Synthase eluierte mit symmetrischem Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert von 4.4.

Weiterhin zeigt das Enzym ein Temperaturoptimum von $35 \text{ }^\circ\text{C}$, sowie ein relativ hohes pH-Optimum von 8.5, mit halbmaximalen Aktivitäten bei pH 7.0 und 9.0.

Untersuchungen zur Substratspezifität zeigten, daß es sich bei der Vinorin-Synthase um ein hoch substratspezifisches Enzym handelt. Von den untersuchten Substraten wurde neben 16-epi-Vellosimin nur dessen 11-Methoxyderivat Gardneral umgesetzt (siehe Tabelle 14). Gardneral weist einen doppelt so großen K_M -Wert auf wie 16-epi-Vellosimin. N_α -Methyl-Derivate des 16-epi-Vellosimins werden ebenso wie Alkaloide mit einer C_{16} -(*R*)-Konfiguration nicht als Substrat akzeptiert. Außer Acetyl-CoA kann kein anderer CoA-Ester, getestet wurden Malonyl-CoA, Benzoyl-CoA, Coumaroyl-CoA und Oleoyl-CoA, als Coenzym fungieren.

Nach den Vorstellungen von KOSKINEN und LOUNASMAA^[95] sollte das erste Alkaloid mit Ajmalingrundgerüst ein 17-Hydroxyindolenin sein. Versuche von PFITZNER und STÖCKIGT^[94] das postulierte Zwischenprodukt anzureichern schlugen fehl. Nach Inkubation von 16-epi-Vellosimin und Gardneral mit angereicherter Vinorin-Synthase in Gegenwart von NaBH_4 bei unterschiedlichen pH-Werten ließ sich kein Reduktionsprodukt vom Ajmalin-Typ akkumulieren. Auch Versuche zur Stabilisierung der gesuchten Verbindung durch Acetylierung führten nicht zum Erfolg.

Tabelle 14: Substratspezifität der Vinorin-Synthase

Substrat	K_M (μM)	V_{max} (pkat)	Substrat	K_M (μM)	V_{max} (pkat)
 16-epi-Vellosimin	19.4	5.0	 Gardneral	39.0	4.3
 21-Deoxyajmalal A (N_{α} -Methyl-16-epi-Vellosimin)	0	0	 N_{α} -Methyl-Gardneral	0	0
 Polyneuridinaldehyd	0	0	 Voachalotinaldehyd	0	0

Weitere kinetische Untersuchungen von PFITZNER et al.^[66] ergaben Hinweise darauf, daß beide Substrate gleichzeitig am aktiven Zentrum unter Bildung eines ternären Komplexes gebunden sein müssen. Dabei erfolgt die Bindung der beiden Substrate an das aktive Zentrum nicht in einer bestimmten Reihenfolge, sondern unabhängig voneinander (random BiBi Mechanism).

Das Auftragen der Reaktionsgeschwindigkeit vor dem Erreichen des Temperaturoptimums gegen die reziproke absolute Temperatur ergab bis zu einer Temperatur von 30 °C einen geradlinigen Verlauf.

Demnach lassen die Untersuchungen von PFITZNER et al.^[66] bezüglich Substratabhängigkeit und Temperaturabhängigkeit der Bildung von Vinorin aus 16-epi-Vellosimin keinen Rückschluß darauf zu, daß bei dieser Reaktion

eine zweite Enzymaktivität beteiligt ist, die die Synthese von 17-Deacetyl-Vinorin katalysieren würde.

Ein erster Enzymtest zur Bestimmung von Vinorin-Synthase-Aktivitäten wurde von PFITZNER^[94] entwickelt. Zur Detektion der Enzymaktivität verwendete er Tritium-markiertes Acetyl-Coenzym A (ca. 1 kBq/Ansatz), das entstandene radioaktive Vinorin wurde mit Essigester extrahiert und die Zählrate bestimmt. Diese Methode wurde von OBITZ^[85] durch einen nicht-radioaktiven, zweistufigen und HPLC-gestützten Enzymtest ersetzt (siehe II.2.2).

2 Enzymatisch unabhängige Reaktion von 16-epi-Vellosimin und Gardneral

Wie in III.1 erwähnt neigen sowohl 16-epi-Vellosimin als auch Gardneral zur Epimerisierung. Besonders hohe pH-Werte beschleunigen diese Umwandlung. Bei der Betrachtung des Mechanismus dieser Reaktion wird der Einfluß des pH-Wertes auf die Reaktionsgeschwindigkeit deutlich. Bei hohen pH-Werten kommt es durch die Stabilisierung der Aldehyd-Gruppe zur zwischenzeitlichen Deprotonierung unter Aufhebung des sterischen Zentrums. Die anschließende erneute Protonierung des nun prochiralen Kohlenstoffs führt zum energetisch günstigeren epimeren Produkt (siehe Abbildung 21).

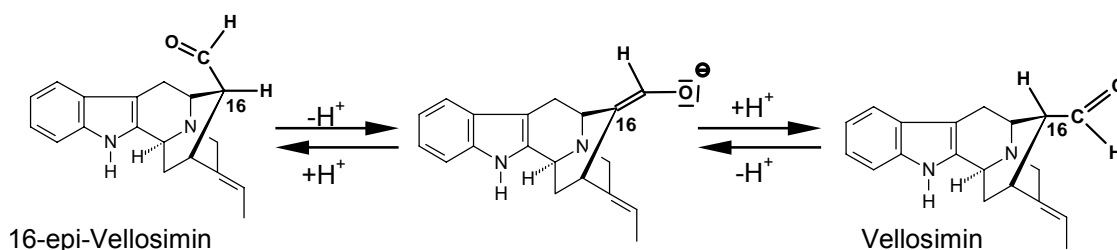


Abbildung 21: Epimerisierung von 16-epi-Vellosimin

Während 16-epi-Vellosimin bei einem pH-Wert von 7.8 mit einer Halbwertszeit von ca. 20 min epimerisiert, ist bei Gardneral bei gleichen Bedingungen eine Epimerisierung kaum zu beobachten. Der große Einfluß der Methoxygruppen auf die Epimerisierungsgeschwindigkeit kann nur auf der Beeinflussung der Ladungsverteilung beruhen, da dieser Rest keine sterische Wirkung auf das C16-Atom haben sollte.

Die deutlich geringere Epimerisierungsgeschwindigkeit von Gardneral im Vergleich zu 16-epi-Vellosimin ermöglicht seinen direkten Einsatz als Substrat bei der Bestimmung von Enzymaktivitäten. Bei der Durchführung des Enzymtests mit 16-epi-Vellosimin als Substrat mußte dieses zunächst in einem vor den eigentlichen Enzymtest vorgeschalteten Schritt enzymatisch aus Polyneuridinaldehyd generiert werden (siehe III.2.1). Diese enzymatische Bildung des Substrates ließ damit nur eine Abschätzung der eingesetzten Substratmenge zu, da zumeist ein vollständiger Umsatz von PNA zu 16-epi-Vellosimin nicht erreicht werden konnte und andererseits die Epimerisierung den Substratgehalt im Reaktionsansatz permanent erniedrigte. Demgegenüber ermöglicht der in dieser Arbeit vorgestellte neu entwickelte Enzymtest auf der Basis von Gardneral, die Substratmenge erstmals genau zu bestimmen und damit die Aktivität der Vinorin-Synthase in den einzelnen Fraktionen sicher quantitativ zu ermitteln (siehe IV.1).

Der C7-C17-Ringschluß zur Ausbildung des Ajmalan-Skeletts erfolgt bei Alkaloiden des Sarpagin-Typs mit 16(S)-Konfiguration (Deoxyajmalal A) bei pH-Werten unter 4 in einer spontanen Reaktion. Das entstehende Indolenin ist jedoch instabil und kann nur durch Reduktion oder durch Acetylierung zu einer 2-Hydroxy, 17-O-Acetyl-Verbindung abgefangen werden^[96]. Auch Aldehyde, die eine zusätzliche Carboxymethylgruppe an C16 besitzen, zeigen diese Reaktion.

Der wahrscheinliche Reaktionsmechanismus der nicht-enzymatischen Bildung von 17-Deacetyl-Vinorin aus 16-epi-Vellosimin ist in Abbildung 22 dargestellt.

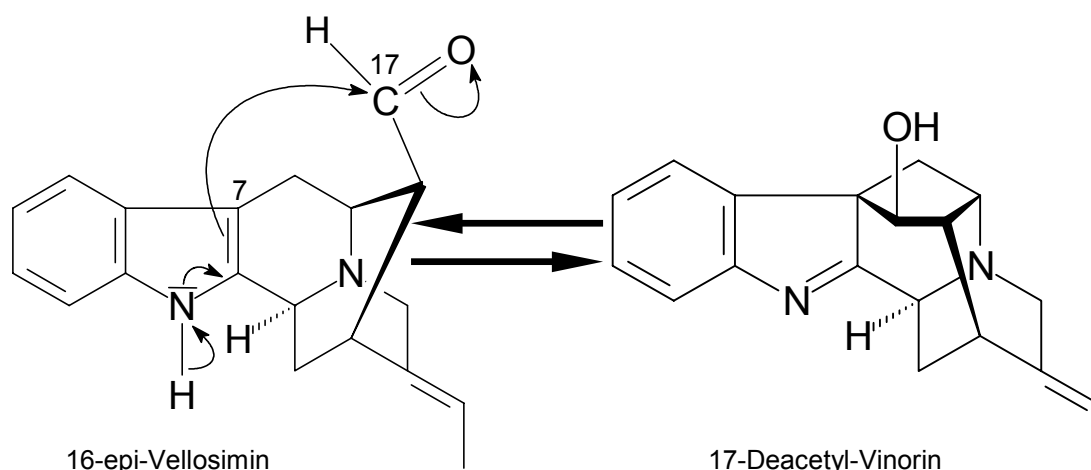


Abbildung 22: Reaktionsmechanismus der nicht-enzymatischen Bildung von 17-Deacetyl-Vinorin aus 16-epi-Vellosimin

Die spontane Zyklisierung ist nur bei den von der Vinorin-Synthase akzeptierten Verbindungen 16-epi-Vellosimin und Gardneral, die eine 16(S)-Konfiguration besitzen, zu beobachten. Bei den entsprechenden Epimeren ist das C7-Atom zu weit vom C17-Atom entfernt, als das das π -Elektronenpaar der Doppelbindung am carbonylischen Kohlenstoff angreifen könnte.

3 Mechanismus der enzymatischen Reaktion

Die Vinorin-Synthase katalysiert den C7/C17-Ringschluß vom 16-epi-Vellosimin zum Vinorin, welches das erste Alkaloid mit hexazyklischer Ajmalan-Grundstruktur darstellt (siehe Abbildung 20).

Ausgehend von 16-epi-Vellosimin kann durch spontane Umsetzung die Bildung der Sarpagan-Alkaloide bzw. durch die Vinorin-Synthase die Umsetzung zu Alkaloiden mit Ajmalan-Grundgerüst erfolgen. Somit kommt 16-epi-Vellosimin und damit auch der Vinorin-Synthase eine zentrale Stellung in der Biosynthese der Ajmalan- und Sarpagan-Alkaloide zu (siehe Abbildung 23).

Auch in der Biosynthese von Morphin ist an einem wichtigen Schritt eine Acetyl-Coenzym-A-abhängige Acetyltransferase beteiligt. Die Acetyl-Coenzym A:Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase katalysiert die Übertragung eines Acetyl-Restes von Acetyl-Coenzym A auf die 7-OH-Gruppe von Salutaridinol. Das dabei gebildete Salutaridinol-7-O-Acetat unterliegt bei einem pH-Wert von 8 bis 9 einer spontanen allylischen Eliminierung, was zur Bildung von Thebain führt, dem ersten Alkaloid vom Morphinan-Typ mit komplettem pentazyklischem Ringsystem^[97,98]. Somit wird sowohl bei der Biosynthese des Ajmalins (siehe V.2) als auch bei der Biosynthese des Morphins der letzte Ringschluß durch eine Acetyl-Coenzym-A-abhängige Acetyltransferase bewerkstelligt.

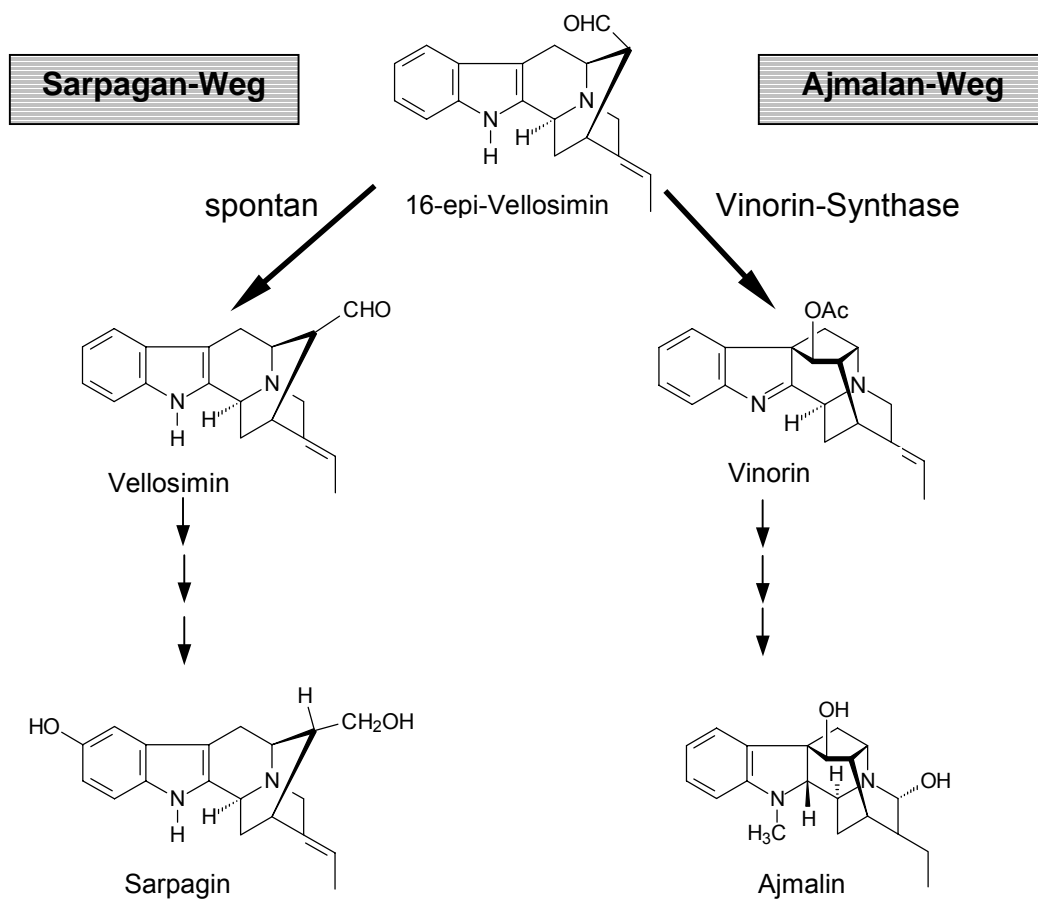


Abbildung 23: Biosynthese von Alkaloiden des Ajmalan- und Sarpagan-Typs ausgehend vom 16-epi-Vellosimin

Bereits 1983 haben PFITZNER et al.^[66] durch kinetische Untersuchungen gezeigt (siehe V.1), daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Bildung von Vinorin aus 16-epi-Vellicosimin durch einen ternären Übergangszustand mit einem random BiBi-Mechanismus gekennzeichnet ist. Dies bedeutet, daß das Acetyl-Coenzym A, das Substrat 16-epi-Vellicosimin und das Enzym in einem Komplex vorliegen, die Reihenfolge des Zusammentreffens aber unerheblich ist.

Wie für einige Acetyltransferasen bereits gezeigt werden konnte, kommt es vor der Übertragung des Acetylrestes zunächst zu einer Umesterung auf das Enzym und damit zu der Bildung eines Acetyl-Enzym-Komplexes^[99,100,101].

Der Reaktionsweg eines ping-pong-Mechanismus mit vorhergegangener Übertragung des Acetylrestes auf das Enzym ist von BASHKAR et al. für eine Acetyl-Coenzym-A-abhängige Acetyltransferase-Reaktion des Acetyl-CoA Decarboxylase/Synthase-Multienzym-Komplexes (ACDS) beschrieben worden^[102].

Bei der Übertragung der Acetyl-Gruppe auf das Enzym, wahrscheinlich auf einen Cystein-Rest, muß zunächst Energie aufgewendet werden. Die Bindungsenthalpie des Acetyl-Coenzym-A-Komplexes liegt etwa 8.8 kJ/mol unterhalb des entstehenden Acetyl-Enzym-Komplexes (siehe Abbildung 24).

Die berechnete Gleichgewichtskonstante K' (siehe Abbildung 24) zeigt, daß das Gleichgewicht der „Umesterung“ auf den Cystein-Rest des Enzyms deutlich auf der Seite der Edukte liegt. Es ergibt sich ein Verhältnis zwischen Edukt und Produkt von 50 zu 1.

Thioesterbindungen sind im allgemeinen deutlich energiereicher als die entsprechenden sauerstoffanalogen Verbindungen. Die Übertragung der Acetyl-Gruppe vom Cystein-Rest auf die OH-Gruppe des 17-Deacetyl-Vinorin ist deshalb wahrscheinlich stark exotherm, wodurch die gesamte Reaktion auf die Seite der Produkte, also die Bildung des Vinorin, verschoben wird.

Die Anwesenheit eines Cystein-Restes im oder in der Nähe des aktiven Zentrums wurde bereits für Acetyltransferasen beschrieben^[104,105]. Auch für

die Vinorin-Synthase kann wahrscheinlich von dem Mechanismus der Umesterung von Acetyl-Coenzym A auf diesen Aminosäure-Rest ausgegangen werden. Hemmstoffversuche mit typischen Sulfhydrylgruppen-Inhibitoren wie Jodacetamid und Jodosobenzoat könnten Hinweise auf das Vorhandensein von SH-Gruppen im aktiven Zentrum geben^[106].

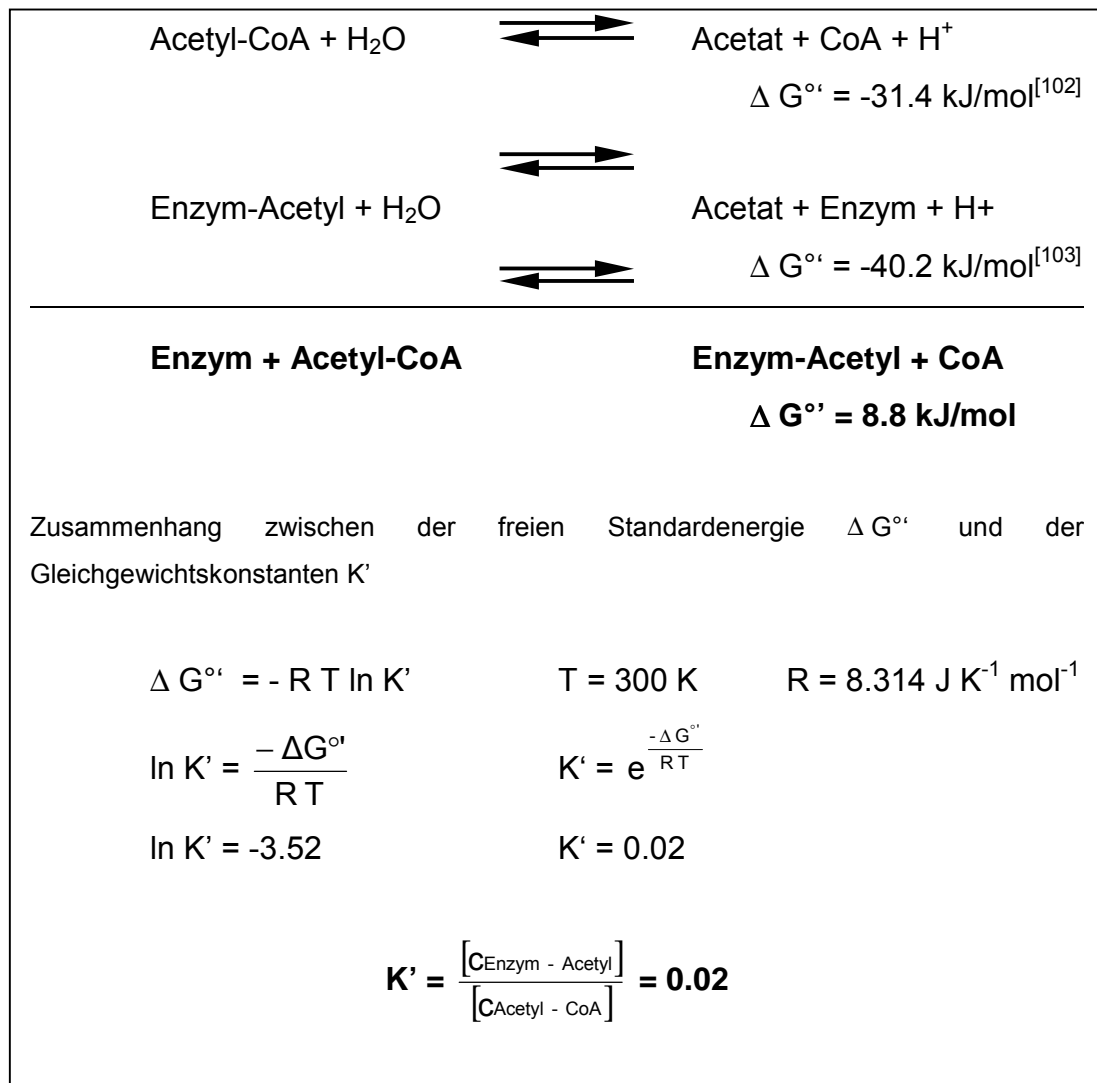


Abbildung 24: Berechnung der freien Standardenergie ΔG° und der Gleichgewichtskonstanten K' für die Bildung des Enzym-Acetyl-Komplexes

Bei der Bildung von Vinorin aus 16-epi-Vellosimin werden zwei neue Bindungen geschlossen; zum einen zwischen C7 und C17, zum anderen wird die neu entstehende OH-Gruppe an C17 acetyliert (siehe Abbildung 20). Versucht man einen Mechanismus für die Reaktion zu postulieren, so sind verschiedene Reaktionsabläufe denkbar.

Einerseits ist vorstellbar, daß zunächst das 17-Deacetyl-Vinorin gebildet und in einem zweiten Schritt dieses Zwischenprodukt acetyliert wird. Andererseits ist auch ein Reaktionsablauf vorstellbar, bei dem beide Prozesse, Ringschluß und Acetylierung, gleichzeitig ablaufen (siehe Abbildung 25).

Bei der Annahme, daß es sich bei der Reaktion um einen zweistufigen Prozeß handelt, ist zu berücksichtigen, daß das gebildete 17-Deacetyl-Vinorin bei physiologischen pH-Werten nur eine sehr geringe Lebensdauer besitzt, so daß davon ausgegangen werden muß, daß es sehr rasch nach der Bildung acetyliert werden müßte.

Sollte es sich tatsächlich um zwei enzymatische Prozesse handeln, die an der Bildung von Vinorin aus 16-epi-Vellosimin beteiligt sind, so werden wahrscheinlich die dafür notwendigen aktiven Zentren in einem Protein lokalisiert sein.

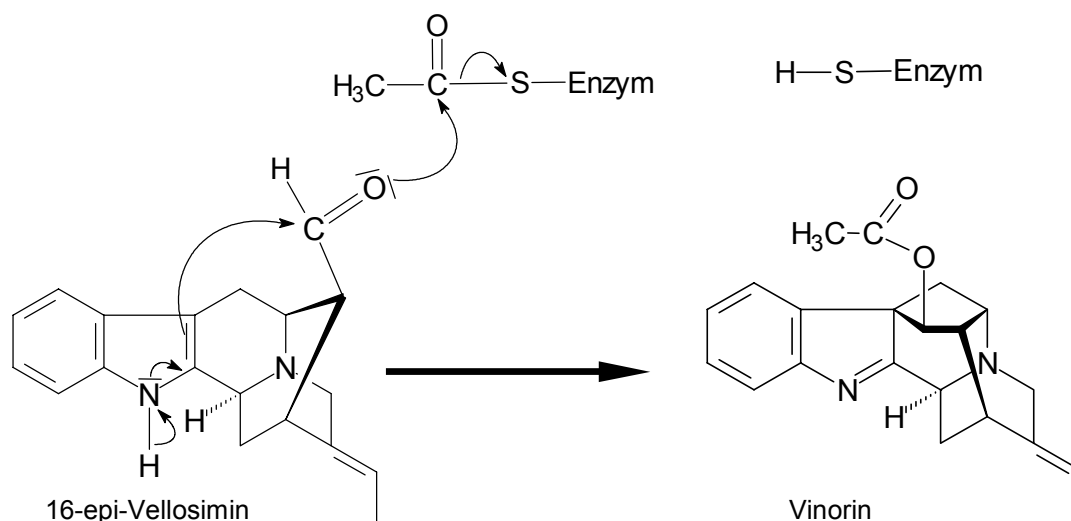


Abbildung 25: Postulierter Reaktionsmechanismus der enzymatischen, Acetyl-Coenzym-A-abhängigen Bildung von Vinorin aus 16-epi-Vellosimin

Denn würden diese beiden Prozesse von verschiedenen Enzymen katalysiert, hätte dies wahrscheinlicherweise zu einem Verschwinden der nachweisbaren Enzymaktivität geführt. Durch die vollständige Trennung der beiden Enzyme wäre kein stabiles Reaktionsprodukt mehr nachweisbar gewesen, da das im ersten Schritt gebildete 17-Deacetyl-Vinorin sich wieder zu 16-epi-Vellosimin zurückbilden und somit scheinbar ein Fehlen von Aktivität vortäuschen würde. Auch die Aktivität der Acetyltransferase könnte durch das Fehlen von 17-Deacetyl-Vinorin nicht detektiert werden (siehe Abbildung 26).

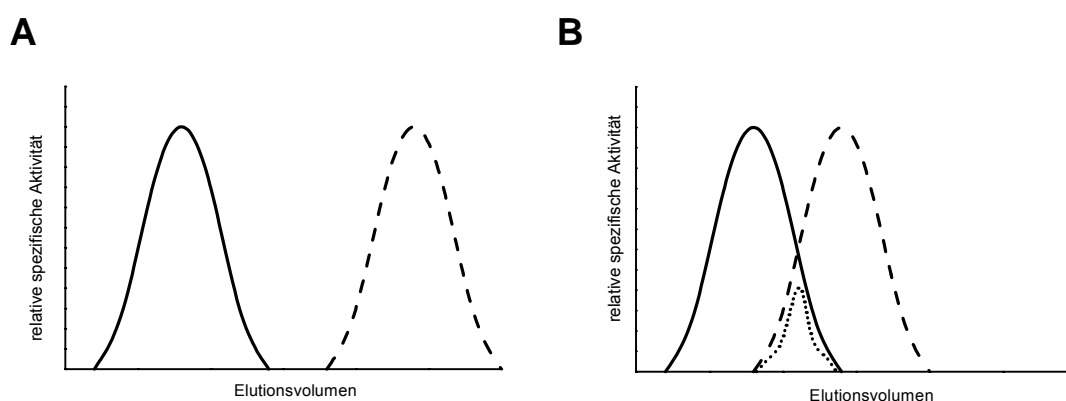


Abbildung 26: Elutionsprofile und meßbare resultierende Aktivität bei der Annahme zweier Enzyme durch vollständige oder überlappende Trennung der postulierten Acetyl-Transferase-Aktivität von der 17-Deacetyl-Vinorin-Synthase-Aktivität

- Aktivität der Acetyl-Transferase
 - - - - - Aktivität der 17-Deacetyl-Vinorin-Synthase-Aktivität
 meßbare Vinorin-Synthase-Aktivität

A vollständige Trennung von Acetyl-Transferase- und 17-Deacetyl-Vinorin-Synthase-Aktivität

—————▶ keine meßbare Vinorin-Synthase-Aktivität

B überlappende Trennung von Acetyl-Transferase- und 17-Deacetyl-Vinorin-Synthase-Aktivität

—————▶ stark verringerte meßbare Vinorin-Synthase-Aktivität

Sämtliche im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Reinigungen, die zu einer ca. 340fachen Anreicherung der Vinorin-Synthase-Aktivität geführt hatten, hätten demnach nicht zur Trennung der beiden Enzyme geführt (siehe V.4). Ein Beispiel für einen ähnlichen Fall, in dem sich zwei Enzymaktivitäten nicht trennen ließen, ist in der Literatur zu finden. FRENZEL und ZENK gelang es trotz 400facher Anreicherung der SAM:3'-Hydroxy-N-Methyl-(S)-Cocclaurin-4'-O-Methyltransferase nicht, eine begleitende 6-O-Methyltransferase-Aktivität abzutrennen. Bei der gelelektrophoretischen Untersuchung der angereicherten Proteinlösung waren nur noch zwei Banden auf dem Gel zu erkennen^[107].

Da es im Verlauf der Reinigung nie zum Verschwinden oder zu einem extremen Abfall der Gesamtaktivität kam, scheint es ausgeschlossen zu sein, daß die Vinorin-Synthase in Wirklichkeit durch zwei Enzyme repräsentiert wird.

Eine durch zwei aktive Zentren katalysierte Reaktion ist wegen der großen Instabilität des 17-Deacetyl-Vinorins nur dann denkbar, wenn die beiden Reaktionszentren eine hohe räumliche Nähe aufweisen, die besonders durch die Anordnung in einem Protein erreichbar wäre.

Eine weitere Möglichkeit für den Mechanismus der Bildung von Vinorin aus 16-epi-Vellosimin wäre, daß auch die Zelle bei der Bildung von Vinorin auf die spontane Bildung von 17-Deacetyl-Vinorin zurückgreift und das Gleichgewicht durch das Acetylieren der zyklisierten Verbindung zugunsten des Ajmalan-Gerüsts verschoben wird. In diesem Falle könnte das Enzym mit dem Synonym Vinorin-Synthase systematisch als Acetyl-Coenzym A:17-Deacetyl-Vinorin-Acetyltransferase bezeichnet werden.

Schließlich ist es denkbar, daß bei der Reaktion sowohl die Acetylierung als auch gleichzeitig aktiv der Ringschluß katalysiert werden, wodurch das aktive Zentrum im Gegensatz zu üblichen Acetyl-Transferasen weitere funktionelle Bereiche aufweisen würde (siehe V.4).

4 Proteinreinigung

Ausgehend von ca. 10 kg *Rauvolfia-serpentina*-Zellkulturgewebe gelang es nach Durchführung des im Verlaufe dieser Arbeit entwickelten Reinigungsschemas (siehe IV.2.5) mit den vier säulenchromatographischen Reinigungsschritten Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q, Chromatographie an Hydroxyapatit, Anionenaustauschchromatographie an Mono Q und Chromatofokussierung an Mono P, die Vinorin-Synthase ca. 340fach anzureichern. Die nach der Chromatofokussierung erhaltene Fraktion mit der höchsten spezifischen Vinorin-Synthase-Aktivität enthielt noch ca. 0.6 mg Gesamtprotein.

Die Größenbestimmung der Vinorin-Synthase mittels Größenausschlußchromatographie an Superdex 75 ergab einen Wert von $43 \text{ kD} \pm 3 \%$. Von PFITZNER wurde dagegen die Größe der Vinorin-Synthase durch Größenausschlußchromatographie an Ultrogel AcA 54 (SERVA, Heidelberg; nicht mehr im Handel) mit $30.5 \text{ kD} \pm 10 \%$ bestimmt^[66].

Die Größenbestimmung basierte in beiden Fällen auf einer Größenausschlußchromatographie. Bei dieser Methode der Größenbestimmung erfolgte die Eichung der Säule mit nahezu globulären Proteinen bekannter Größe. Dies kann dazu führen, daß, wenn die Form des untersuchten Proteins von der kugelförmigen Gestalt abweicht, ein höheres Molekulargewicht als das tatsächliche ermittelt wird. Da jedoch die Bestimmung des Molekulargewichts in beiden Fällen mittels Größenausschlußchromatographie erfolgte, ist der Fehler der Bestimmungsmethode sowie der Fehler infolge des Einsatzes unterschiedlicher Chromatographiematerialien mit Sicherheit geringer einzuschätzen, als die Abweichung der von PFITZNER und der im Verlauf dieser Arbeit ermittelten Daten.

Da die Experimente zur Größenbestimmung mehrfach wiederholt wurden, sowohl die Eichung der Säule, als auch die eigentliche Molekulargewichtsbestimmung, wurde bei der Auswertung der SDS-Gele vor allem der Bereich um 45 kD nach einer in Frage kommenden Bande untersucht. In diesem

Bereich war aber in keinem Fall eine entsprechende Bande zu erkennen, bei der die Bandenstärke der einzelnen Fraktion in Relation zur Aktivität der Vinorin-Synthase stand (siehe V.2.3). Deshalb wurde der gesamte Bereich zwischen 30 kD und 50 kD nach einer in Frage kommenden Bande untersucht.

Es ließ sich jedoch auch in dem erweiterten Bereich keine solche Bande finden. Insgesamt waren nur ca. 10 unterschiedliche, deutlich erkennbare Banden vorhanden, die aber aufgrund ihrer Bandenstärke verglichen mit der enzymatischen Aktivität ausgeschlossen werden konnten.

Auch durch die Kombination der BNE mit der SDS-PAGE (siehe IV.2.3.2) sollte die Anzahl der für die Vinorin-Synthase in Frage kommenden Banden deutlich reduziert werden. Die durch diese Methode als mögliche Bande der Vinorin-Synthase ermittelte (siehe IV.2.3.2.2) erwies sich jedoch nach proteolytischer Spaltung mit der Endoproteinase LysC, der Bestimmung interner Aminosäuresequenzen (siehe IV.2.3.2.3) und Homologievergleich der ermittelten Peptidsequenzen mit bereits ermittelten Peptidsequenzen (siehe IV.2.3.2.4) als ein Hitzeschockprotein der Hitzeschockprotein-Familie HSP 90^[87,88,89,90].

Weiterhin führte auch der Vergleich Vinorin-Synthase-aktiver Fraktionen verschiedener Zelllinien, wie *Rauvolfia serpentina* „T 30“, *Rauvolfia serpentina* „München“, *Rauvolfia serpentina* × *Rhazya stricta*, die mit Hilfe des gleichen Reinigungsschema erhalten wurden, zu keiner Identifizierung einer Bande im Bereich zwischen 30 kD und 50 kD als Vinorin-Synthase.

Daß die Vinorin-Synthase keiner der Banden auf den nach den verschiedenen Reinigungsprotokollen angefertigten SDS-Gelen zugeordnet werden konnte, kann verschiedene Ursachen haben.

Einerseits ist es möglich, daß am Ende einer Reinigung ein weiteres Protein verblieben ist, das die gleiche Größe wie die Vinorin-Synthase besitzt, so daß durch die Überlagerung dieser beiden Proteine auf dem Gel der zu erwartende Bandenstärkeverlauf nicht zu erkennen gewesen ist. Im Verlauf dieser Arbeit wurde eine Vielzahl von Reinigungen durchgeführt, die nach

mehr oder weniger stark modifizierten Reinigungsprotokollen durchgeführt wurden, so daß viele verschiedene Gele erhalten wurden, die unterschiedliche Bandenmuster aufweisen. Aus diesem Grund sollte nicht in allen Gelen die Überlagerung Ursache für die Nichtzuordnung einer Bande zur Vinorin-Synthase gewesen sein.

Eine weitere mögliche Ursache für die nicht gelungene Identifizierung einer Bande als Vinorin-Synthase ist, daß die Proteinmenge der aufgetragenen Vinorin-Synthase so gering war, daß sie nach Färbung nicht sichtbar wäre. Für die Bereitung der SDS-Gele wurden bis zu 70 µl Proteinlösung mit einer Aktivität von ca. 75.0 pkat/mg mit einer 340fachen Anreicherung und einer Proteinmenge von ca. 30 µg aufgetragen.

Mittels Coomassie-Färbung lassen sich noch 0.1 – 0.3 µg Protein je Bande nachweisen^[108]. Für die Bestimmung interner Aminosäuresequenzen ist eine nach Coomassie-Färbung deutlich sichtbare Bande, entsprechend einer Proteinmenge von ca. 5 µg, notwendig.

Das Problem, daß die Bande der Vinorin-Synthase zu schwach ist, um im SDS-Gel erkennbar zu sein, läßt sich auch dadurch nicht beseitigen, daß mehr Protein auf das Gel aufgetragen wird, da es zur Überladung des Gels kommt, wodurch die Trennung deutlich verschlechtert wird.

Vergleicht man die erfolgreich verlaufene Reinigung der PNA-Esterase^[78] sowie der Raucaffricin-Glucosidase^[76,77] mit der Reinigung der Vinorin-Synthase, so fällt auf, daß die spezifische Aktivität der Vinorin-Synthase nach dem Zellaufschluß ca. um den Faktor 1000 niedriger ist, als bei den oben genannten Proteinen (siehe Tabelle 15). Da die Inkubationszeit ähnlich war und die Substratkonzentration pro Testansatz bei den Aktivitätsbestimmungen für alle 3 Enzyme in der gleichen Größenordnung und jeweils im Bereich der Maximalgeschwindigkeit V_{max} lagen, lassen sich die spezifischen Aktivitäten direkt miteinander vergleichen. Aus der spezifischen Aktivität kann jedoch nicht direkt auf das Mengenverhältnis von zu reinigendem Enzym zur Gesamtproteinmenge geschlossen werden. Dieses Verhältnis wird im wesentlichen durch das Molekulargewicht und die Wechselzahl des Enzyms

bestimmt, welche durch die Anzahl von Substratmolekülen, die bei vollständiger Sättigung des Enzyms mit Substrat pro Zeiteinheit in das Produkt umgewandelt werden, definiert ist.

Für die PNA-Esterase konnte die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} mit 0.57 nkat/ μg bestimmt werden, aus der sich unter Berücksichtigung der Masse von 30 kD eine Wechselzahl von 1020 min^{-1} ergibt. In der Literatur sind Wechselzahlen für Acetyl-Coenzym-A-abhängige Acetyltransferasen angegeben, wie z.B. für die Acetyl-CoA:Chloramphenicol 3-O-Acetyltransferase aus *Escherichia coli* mit 7680 min^{-1} ^[109] sowie für die Acetyl-CoA:L-Serin O-Acetyltransferase aus *Salmonella typhimurium* mit 12.000 min^{-1} ^[110].

Tabelle 15: Vergleichende Darstellung der spezifischen Aktivitäten und Anreicherungsfaktoren bei der Reinigung der Vinorin-Synthase, Raucaffricin-Glucosidase und PNA-Esterase

Enzym	Proteinmenge im Rohextrakt [mg]	Aktivität im Rohextrakt [nkat]	Spez. Aktivität im Rohextrakt [nkat/mg]	Anreicherungsfaktor am Ende der Reinigung
Vinorin-Synthase	13100	2.8	0.0002	340
Raucaffricin-Glucosidase	1440	576	0.4	340
PNA-Esterase	3000	1140	0.4	423

Geht man davon aus, daß die Vinorin-Synthase eine ähnlich hohe Wechselzahl wie die anderen Acetyl-Coenzym-A-abhängigen Acetyltransferasen hat, und damit eine etwa 10fach höhere Katalysegeschwindigkeit besitzt, als die charakterisierte PNA-Esterase, so ergibt sich in Verbindung mit der einhergehenden 1000fach geringeren spezifischen Aktivität im Zellaufschluß gegenüber der PNA-Esterase eine 10.000fach geringere Konzentration der Vinorin-Synthase im Vergleich zur PNA-Esterase im Zellaufschluß. Selbst unter Berücksichtigung der Tatsache, daß die Vinorin-Synthase eine deutlich

geringere Aktivität, respektive Wechselzahl, zeigen sollte als die anderen erwähnten Acetyltransferasen und damit das Konzentrationsverhältnis weniger dramatisch ausfallen sollte, so ergibt sich dennoch, daß eine um Größenordnungen höhere Aufreinigung nötig wäre. Bei der Annahme, daß die PNA-Esterase und Raucaffricin-Glucosidase beispielsweise in 100fach höherer Konzentration im Zellaufschluß enthalten wären, müßte bei der Reinigung der Vinorin-Synthase eine 100fach höhere Anreicherung erzielt werden, um in dem im Anschluß an eine Reinigung angefertigten SDS-Gel gleiche Bandenstärkeverhältnisse zwischen der Bande der Vinorin-Synthase zu verbleibenden Fremdbanden zu erhalten.

Da die Ausgangskonzentration der Vinorin-Synthase um Größenordnungen geringer zu sein scheint als die der PNA-Esterase und Raucaffricin-Glucosidase, aber die erzielten Anreicherungen für die 3 Enzyme im gleichen Bereich lagen (siehe Tabelle 15), ist es denkbar, daß die Bande der Vinorin-Synthase zu schwach im SDS-Gel vorliegt, um nach der 340fachen Anreicherung als deutlich sichtbare Bande identifiziert werden zu können.

Sollte die Konzentration der Vinorin-Synthase tatsächlich um Größenordnungen niedriger liegen als die der anderen Enzyme, würde das durch eine geringere Expression dieses Enzyms in den Zellkulturen bedingt. Wahrscheinlich ließe sich in der intakten Pflanze ein höherer Anteil dieses Enzyms an der Gesamtproteinmenge finden. Häufig wird in Zellkulturen sogar das vollständige Fehlen der Expression eines Enzyms beobachtet, was im allgemeinen zum vollständigen Erliegen der Biosynthese eines Stoffes führt.

Auch für die verwendeten Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* wurde dies für einige Zelllinien beobachtet. In diesen konnte keine Aktivität der 17-O-Acetyl-Ajmalan-Esterase mehr nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde eine Anreicherung von Acetyljmalin neben wenig Ajmalin in den Zellen beobachtet^[111].

Sinnvoll wäre es demnach zu versuchen, die Expression des gewünschten Enzyms zu erhöhen, bspw. durch Elicitierung mit Methyljasmonat. Wie bereits für die auch im Rahmen dieser Arbeit eingesetzte Zellkultur aus dem somatischen Hybrid aus *Rauvolfia serpentina* und *Rhazya stricta* gezeigt

werden konnte, führte die Behandlung der Zellkultur mit Methyljasmonat zu einer Erhöhung des Alkaloidgehaltes bspw. von Raucaffricin, 17-O-Acetyljmalin und 17-O-Acetylnorajmalin sowie auch zu einer Veränderung des Alkaloidmusters^[112]. Neben der daraus zu folgernden erhöhten Expression beteiligter Enzyme, könnte es auch zu einer erhöhten Expression der Vinorin-Synthase gekommen sein. Durch den Einsatz einer solchen elicitierten Zellkultur mit erhöhter Vinorin-Synthase-Expression könnte die Anforderung an die Reinigung erniedrigt werden.

Eine weitere Ursache für die Nichtzuordnung einer Bande könnte sein, daß das Protein aus zwei Teilen aufgebaut ist, welche bei der Behandlung mit SDS getrennt werden. Diese Teile wären aber eventuell so klein, daß sie aus dem untersuchbaren Bereich des Gels wandern; für die Identifizierung einer Bande <25 kD hätten stärker vernetzte Gele zum Einsatz kommen müssen.

Der Aufbau aus Untereinheiten wurde bereits für verschiedene Acetyltransferasen beschrieben. So handelt es sich bei der Acetyl-CoA:Deacetylvindolin 4-O-Acetyltransferase um ein Enzym, das aus zwei Teilproteinen aufgebaut ist^[113,114]. Da es sich bei diesem Protein um ein Enzym der Biosynthese von Vindolin in *Catharanthus roseus* handelt, welche hohe Verwandtschaft zur Gattung Rauwolfia zeigt, kann auch für die Vinorin-Synthase ein Aufbau aus zwei Untereinheiten nicht ausgeschlossen werden. Auch die Cetyl-CoA:L-Serin O-Acetyltransferase beschrieben aus *Brassica chinensis*^[115], *Escherichia coli*^[116] und *Salmonella typhimurium*^[110] sowie die umfassend untersuchte Acetyl-CoA:Chloramphenicol 3-O-Acetyltransferase^[118] bestehen aus mehreren Untereinheiten.

Die Vermutung, daß das Protein aus zwei Teilen zusammengesetzt sein könnte ließe sich durch folgende Überlegung stützen: In V.3 wurde eine Möglichkeit angenommen, daß das Protein zwei Domänen enthält, bei dem in einer zunächst der Ringschluß und in der anderen die Acetylierung erfolgen würde. Es wäre möglich, daß diese beiden reaktiven Domänen von zwei verschiedenen Genen codiert würden und das Protein anschließend in einer Quartärstruktur zusammengefügt würde. Dies hätte den entwicklungs-

geschichtlichen Vorteil, daß die Pflanze in der Entwicklung der Vinorin-Synthase auf ein bereits existierendes Enzym, das eine C-C-Bindungsknüpfung katalysiert, und eine klassische Acetyltransferase zurückgegriffen hätte und diese nach geringfügiger Veränderung zusammengefügt hätte (siehe V.5).

5 Ausblick

Nach Erhalt von internen Aminosäuresequenzen für die Vinorin-Synthase ist es das Ziel, durch molekularbiologische Methoden die Nucleotidsequenz des für die Vinorin-Synthase codierenden Gens zu ermitteln und durch heterologe Expression des Gens eine ausreichende Menge Vinorin-Synthase zu erhalten, um Untersuchungen zum Mechanismus der katalysierten Reaktion durchzuführen.

Diese Strategie der Ermittlung der Aminosäuresequenz eines Enzyms sowie seine heterologe Expression führte bereits für die an der Biosynthese von Ajmalin beteiligten Enzyme Strictosidin-Synthase^[71,72,73], Strictosidin-Glucosidase^[120], Raucaffricin-Glucosidase^[76,77] und PNA-Esterase^[78] zum Erfolg.

Um doch noch interne Sequenzen der Vinorin-Synthase zu erhalten, könnte versucht werden die Reinigung weiter zu optimieren. Zu diesem Zweck sollte die Gardneral-Menge pro Testansatz erhöht werden. Die zur Verfügung stehende Substratmenge erzwang einen sehr sparsamen Einsatz, wodurch auch beim Enzymtest mit dem Substrat Gardneral quantitative Aussagen bzgl. der Aktivität und damit auch des Reinigungserfolgs unsicher wurden. Wie bereits beschrieben (siehe IV.1) ist eine quantitative Bestimmung von Enzymaktivitäten ein wichtiger Faktor bei der Optimierung einer Reinigung. Zum anderen müßten weitere Trennmethode getestet werden, wie z.B. die präparative isoelektrische Fokussierung oder Affinitätschromatographie.

Die Affinitätschromatographie ist die Trennmethode mit der größten Spezifität und Selektivität bei der Reinigung von Enzymen. Sie beruht auf der reversiblen, spezifischen Bindung des zu reinigenden Enzyms an einen individuellen an eine Matrix gebundenen Bindungspartner. Während der Reinigung soll das Protein selektiv an den immobilisierten Liganden binden, während idealerweise alle übrigen Proteine nicht binden und damit abgetrennt werden. Die Elution erfolgt dann durch eine kompetitive Verdrängung aus der Bindung oder durch einen Konformationswechsel aufgrund einer Änderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke. Die Bindung des Adsorbenten an den Liganden muß eine ausreichend stark sein. Eine zu starke Bindung erschwert jedoch die Elution, die dann eventuell nur unter denaturierenden oder inaktivierenden Bedingungen möglich ist.

Bei der Auswahl eines Liganden für die Affinitätschromatographie wird zwischen monospezifischen und gruppenspezifischen Liganden unterschieden werden. An gruppenspezifische Liganden binden alle ähnlichen Proteine aus einer Klasse an die Affinitätsmatrix. Wegen der strukturellen Ähnlichkeit von Triazin-Farbstoffen wie z.B. Procion Red HE-3B (*Amersham Pharmacia, Freiburg*) mit Nucleotid-Cosubstraten, wird dieser gruppenspezifische Ligand vor allem zur Reinigung NADP⁺-abhängiger Enzyme eingesetzt^[121,122,123]. Für die Reinigung von Serin-Proteasen können als Liganden p-Aminobenzamidin und L-Arginin zum Einsatz kommen^[124,125].

Eine monospezifische Wechselwirkung erfolgt ausschließlich zwischen einem definierten Bindungspaar, wie Antikörper und Antigen, Enzyminhibitor und Enzym, Substrat und Enzym, Hormon und Rezeptor.

Für die Erzeugung von Antikörpern wird bereits reines Protein benötigt. Was das Ziel dieser Reinigung vorweg nehmen würde. Weiterhin ist es möglich die Bindungsstelle der Substrate auszunutzen. Wie in IV.2.2.7.2 beschrieben wurde ein käuflich erhältliches Affinitätsmaterial getestet, das mit kovalent gebundenem Coenzym A besetzt ist. Die Vinorin-Synthase adsorbierte nicht an dem Material.

Bei der Reinigung einer anderen Acetyl-Coenzym-A-abhängige Acetyltransferasen 17-O-Acetyltransferase aus *Catharanthus roseus* konnte ein Affinitätsmaterial mit Coenzym A bereits erfolgreich eingesetzt werden^[113].

Ursächlich für die fehlende Adsorption könnte eine nur geringe Affinität des Enzyms zu Coenzym A sein, da es sich bei dem eigentlichen Cosubstrat um Acetyl-Coenzym A handelt. Deshalb wäre es sinnvoll ein Material zu testen, daß mit der acetylierten Form des Coenzym A besetzt ist. Da im Handel kein Trennmaterial mit Acetyl-Coenzym A als Ligand erhältlich ist, ferner die Herstellung des Materials mit hohem Aufwand verbunden ist und das Material sehr instabil ist sowie eine Eignung als affines Material nicht prognostizierbar war wurde eine Affinitätschromatographie an Acetyl-Coenzym A nicht durchgeführt.

Als weitere Möglichkeit eines Liganden für die Affinitätschromatographie bieten sich die von der Vinorin-Synthase als Substrat akzeptierten Moleküle 16-epi-Vellosimin und Gardneral an. Der erfolgreiche Einsatz von 16-epi-Vellosimin als Ligand ist eher unwahrscheinlich, da 16-epi-Vellosimin innerhalb weniger Stunden epimerisiert und damit wahrscheinlich nicht mehr am aktiven Zentrum des Enzyms reversibel gebunden wird. Dieses Problem würde sich bei der Verwendung von Gardneral nicht stellen. Um Gardneral als affine Gruppe verwenden zu können, muß das Molekül kovalent an die Matrix gebunden werden. Da die eingeführte Methoxy-Gruppe beim Gardneral einen verhältnismäßig geringen Einfluß auf den K_M -Wert in Bezug auf 16-epi-Vellosimin hat, erscheint es sinnvoll, die kovalente Bindung an die Matrix über diesen Bereich des Moleküls zu knüpfen.

Neben den hohen chemischen und sterischen Anforderungen an die Herstellung des Materials steht dieser Methode die geringe Verfügbarkeit von Gardneral bzw. 16-epi-Vellosimin entgegen.

Da die meisten physikalischen Eigenschaften der Vinorin-Synthase, wie Anionenstärke, Größe, isoelektrischer Punkt, hydrophobe Gruppen bereits für die Reinigung genutzt wurden und andere Eigenschaften wie Kationenstärke nicht genutzt werden können, da sie wie bei diesem Beispiel nur unter Verlust der Enzymaktivität anwendbar sind (siehe IV.22.7.1), ist anzuzweifeln, daß der Weg zum Erhalt des die Vinorin-Synthase codierenden Gens über die Proteinreinigung zum Erfolg führt.

Eine andere Möglichkeit die Aminosäuresequenz des gesuchten Enzyms aufzuklären, wäre durch den Einsatz degenerierter Primer bekannter Acetyltransferasen das codierende Gen in der DNA zu identifizieren. Bei diesem sogenannten „Homology Cloning“ werden familienspezifische Sequenzen für die Ableitung der Primer genutzt und mit diesen mittels PCR eine homologe DNA-Sequenz amplifiziert. Durch Screenen der cDNA-Bibliothek könnte dann das entsprechende Gen identifiziert werden.

Diese Methode wurde bereits häufig erfolgreich angewendet, unter anderem für das Enzym Dhurrinase aus *Sorghum bicolor*^[126,127]. Als Primer wurden dabei Nucleotide eingesetzt, die homolog zu einer hochkonservierten Region der Mais-Glucosidase waren. Weitere Beispiele sind zwei Polyphenol-Oxidasen aus *Phytolacca americana*^[128] sowie die (+)- δ -Cadinen-Synthase aus Zellkulturen von *Gossypium arboreum*^[129].

Bei dem Enzym Vinorin-Synthase handelt es sich mechanistisch um eine Acetyl-Coenzym A abhängige Acetyltransferase.

Auch Acetyltransferasen zeigen untereinander hohe Homologien, so daß möglicherweise beim Screenen der cDNA-Bibliothek, die im Arbeitskreis bereits für *Rauvolfia serpentina* angelegt wurde, das gesuchte Gen identifiziert werden kann. Das so identifizierte Gen wird anschließend in Bakterien- oder Hefezellen (z.B. *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*) transformiert und das exprimierte Protein auf Vinorin-Synthase-Aktivität untersucht. Wird die gewünschte Aktivität detektiert, so kann davon ausgegangen werden, daß das exprimierte Protein identisch mit der Vinorin-Synthase ist.

Das Problem bei diesem Verfahren ist, daß es sehr viele verschiedene Acetyl-Coenzym-A-abhängige Acetyltransferasen gibt, so daß ein hoher Aufwand notwendig ist, um die gesuchte Transferase zu erhalten.

Die homologen Bereiche eines Enzyms sind im allgemeinen die, die das aktive Zentrum bilden, da ihre Veränderung im allgemeinen zu einer Funktionsstörung des katalytischen Prozesses führen und damit diese Zentren durch Negativauslese konserviert werden.

Wie in V.3 bereits angedeutet ist es möglich, daß gerade die Vinorin-Synthase nur geringe Homologien zu anderen Acetyltransferasen aufzeigt, falls sowohl die Acetyl-Übertragung, als auch der Ringschluß aktiv in einem Zentrum katalysiert würden. In diesem Fall würde dies Veränderungen im aktiven Zentrum bedeuten, die mit einer Erniedrigung der Homologien zu anderen Acetyltransferasen einhergingen.

Würde dagegen das Enzym durch zwei Gene codiert, einem Gen, daß die 17-Deacetyl-Vinorin-Synthase codiert und einem Gen, welches für die Acetyltransferase-Domäne codiert (siehe

Abbildung 27), so ließe sich bei Einsatz von Primern, die homolog zu hochkonservierten Regionen von Acetyltransferasen sind, bei der Methode des „Homology Cloning“ nur das Gen für die Acetyltransferase-Domäne finden. Der Enzymaktivitätstest auf Vinorin-Synthase-Aktivität mit dem heterolog exprimierten Protein würde in diesem Fall negativ ausfallen (siehe Abbildung 26).

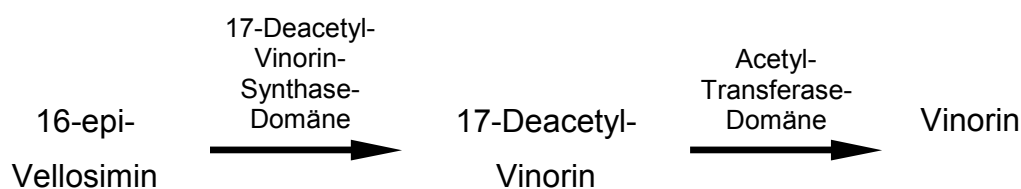


Abbildung 27: Postulierter Reaktionsablauf von 16-epi-Vellosimin zu Vinorin katalysiert durch ein Enzym mit zwei Domänen

Wie oben erwähnt wurde aus Zellkulturen von *Catharanthus roseus*, eine zu *Rauvolfia serpentina* sehr eng verwandte Apocynaceae bereits das für die Acetyl-CoA:Deacetylvindolin 4-O-Acetyltransferase (DAT) (EC 2.3.1.107) codierende Gen isoliert und charakterisiert^[130]. Das Enzym katalysiert den letzten Schritt der Biosynthese des Vindolins. Diese enge Verwandtschaft läßt es möglich erscheinen mittels Homology Cloning die gesuchte Aminosäuresequenz der Vinorin-Synthase zu erhalten.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befaßte sich mit der Reinigung und Charakterisierung des Enzyms Vinorin-Synthase aus Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina* BENTHAM ex KURZ. Dieses Acetyl-Coenzym-A-abhängige Enzym katalysiert im Biosyntheseweg des Alkaloids Ajmalin die Umwandlung von 16-epi-Vellosimin zu Vinorin.

Da der Reinigungserfolg eines Enzyms wesentlich durch die eindeutige qualitative und vor allem auch durch die quantitative Bestimmung der Enzymaktivität bestimmt wird, wurde ein neuer einstufiger Enzymaktivitätstest mit dem Substrat Gardneral erarbeitet. Mit Hilfe dieses Tests ist eine einfache und schnelle qualitative sowie quantitative Bestimmung der Aktivität der Vinorin-Synthase möglich.

Die Größe der Vinorin-Synthase wurde durch Größenausschlußchromatographie an Superdex 75 bestimmt. Nach Eichung der Säule konnte für die Vinorin-Synthase ein Molekulargewicht von $43 \text{ kD} \pm 3 \%$ ermittelt werden.

Das entwickelte Reinigungsschema mit den vier säulenchromatographischen Reinigungsschritten Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q, Chromatographie an Hydroxyapatit, Anionenaustauschchromatographie an Mono Q und Chromatofokussierung an Mono P führte, ausgehend von ca. 10 kg *Rauvolfia-serpentina*-Zellkulturgewebe, zu einer 340fachen Anreicherung der Vinorin-Synthase bis zu einer spezifischen Aktivität von 75.0 pkat/mg bei einer Ausbeute.

Das nach der Reinigung angefertigte SDS-Gel ermöglichte keine Zuordnung einer Bande zur Bande der Vinorin-Synthase.

Die durch die Kombination der BNE mit der SDS-PAGE zunächst als Vinorin-Synthase identifizierte Bande erwies sich nach proteolytischer Spaltung mit der Endoproteinase LysC, der Bestimmung interner Aminosäuresequenzen und abschließendem Homologievergleich der ermittelten Peptidsequenzen mit

Hilfe der *Swiss-Prot*-Datenbank, als ein Protein der Hitzeschockprotein-Familie HSP 90.

Der Vergleich Vinorin-Synthase-aktiver Fraktionen verschiedener Zelllinien, wie *Rauvolfia serpentina* „T 30“, *Rauvolfia serpentina* „München“, *Rauvolfia serpentina* × *Rhazya stricta*, die mit Hilfe des gleichen Reinigungsschema erhalten wurden, führte ebenfalls nicht zur Identifizierung der Bande der Vinorin-Synthase im SDS-Gel.

Mögliche Ursachen für die Nichtzuordnung einer Bande im SDS-Gel zur Vinorin-Synthase sind in einer Überlagerung eines Fremdprotein mit der Vinorin-Synthase, eine zu niedrige Expression der Vinorin-Synthase, die eine deutlich bessere Anreicherung erfordern würde oder der Aufbau des Proteins aus Untereinheiten, in die es während der Behandlung mit SDS zerfällt, gegeben.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- 1 ZUBAY, G.: Biochemie. Übersetzung der 4. Auflage, McGraw-Hill Internat. London, Frankfurt am Main u.a. (1999).
- 2 LOTTSPREICH, F.: Proteinreinigung *In: Bioanalytik*, LOTTSPREICH, F.; ZORBAS, H. (Eds.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, (1998).
- 3 SANGER, F.; TUPPY, H.: The amino acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin. *Biochem. J.* 49, 463-490 (1951).
- 4 SANGER, F.; THOMPSON, E.O.P.: The amino acid sequence in the glycol chain of insulin. *Biochem. J.* 53, 353-374 (1953).
- 5 WATSON, J.P.; CRICK, F.H.C.: Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171, 737-738 (1953).
- 6 CRICK, F.H.C., BARNETT, L.; BRENNER, S.; WATTS-TOBIN, R.J.: General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 192, 1227-1232 (1961).
- 7 CRICK, F.H.C.: The genetic code III. *Sci. Amer.* 215, 55-62 (1966).
- 8 ZIMMERMANN, J.: DNA-Sequenzierung. *In: Bioanalytik*, LOTTSPREICH, F.; ZORBAS, H. (Eds.), Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, (1998).
- 9 GILBERT, W.: DNA sequencing and gene structure. *Science* 214, 1305-1312 (1981).
- 10 <http://www.expasy.ch/sprot/sprot-top.html>

-
- 11 DOLITTLE, R.: Similar amino acid sequences chances or common ancestry. *Science* 214, 149-159 (1981).
- 12 Botanik-Online: http://www.rrz.uni-hamburg/de/biologie/b_online
- 13 LUCKNER, M.: Secondary Metabolism in Miroorganism, Plants and Animals. 3. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong Kong (1990).
- 14 FUGMANN, B.; LANG-FUGMANN, S.; STEGLICH, W. (Hrsg.): Römpp-Lexikon Naturstoffe. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (1997).
- 15 THIERICKE, R.; ROHR, J.: Biological variation of microbial metabolites by precursor-directed biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 10, 265-289 (1993).
- 16 OMURA, S.; SADEKANE, N.; TANAKA, Y.; MATSUBARA, H.: Chimeramycins: new macrolide antibiotics produced by hybrid biosynthesis. *J. Antibiot. Tokyo* 36, 927-930 (1983).
- 17 GREGSON, J.M.; CHEN, J.L.; PATTERSON, G.M.L., MOORE, R.E.: Structures of Puwainphycins A-E. *Tetrahedron* 48, 3727-3734 (1992).
- 18 SCHÖPF, C.: Die Synthese von Naturstoffen, insbesondere von Alkaloiden, unter physiologischen Bedingungen und ihre Bedeutung für die Frage der Entstehung einiger pflanzlicher Naturstoffe in der Zelle. *Angew. Chemie* 50, 779-787 und 797-805 (1937).
- 19 VEDERAS, J.C.: The use of stable isotopes in biosynthetic studies. *Nat. Prod. Rep.* 4 (3), 277-337 (1987).
- 20 FLOSS, H.G.; BEALE, J.M.: Untersuchungen zur Biosynthese von Antibiotica. *Angew. Chemie* 101, 147-179 (1989).

-
- 21 HUTCHINSON, C.R.: Biological methods for studying the biosynthesis of natural products. *Nat. Prod. Rep.* 3, 133-152 (1986).
- 22 GRÄFE, U.: Biochemie der Antibiotika. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York (1992).
- 23 GRISEBACH, H.; HAHLBROCK, K.: Enzymology and regulation of flavonoid and lignin biosynthesis in plants and plant cell suspension cultures. *Recent Adv. Phytochemistry* 8, 21-52 (1974).
- 24 KOCHS, G.; GRISEBACH, H.: Enzymatic synthesis of isoflavones. *Eur. J. Biochem.* 155, 311-318 (1986).
- 25 STÖCKIGT, J.; MANSELL, R.L.; GROß, G.G.; ZENK, M.H.: Enzymatic reduction of p-coumaric acid via p-coumaroyl-CoA to p-coumaroyl alcohol by a cell-free system from *Forsythia sp.* *Z. Pflanzenphysiol.* 70, 305-307 (1973).
- 26 KREIS, W.; FULZELE, D.P.; HOELZ, H.; VAL, J.; REINHARD, E.: Production of cardenolides by *Digitalis* cell cultures – models and process options. In: *Plant Tissue Culture and Gene Manipulation for Breeding and Formation of Phytochemicals*, OONO, K. et al. (Eds.), NIAR/Japan, 335-354 (1992).
- 27 KUTCHAN, T.M.; ZENK, M.H.: Enzymology and molecular biology of benzophenanthridine alkaloid biosynthesis. *J. Plant Res. Special Issue* 3, 165-175 (1993).
- 28 ZENK, M.H.: The formation of benzophenanthridine alkaloids. *Pure Appl. Chem.* 66, 2023-2028 (1994).

-
- 29 ZENK, M.H.; RÜFFER, M.; DEUS-NEUMANN, B.: Benzylisoquinoline biosynthesis by cultivated plant cells and isolated enzymes. *J. Nat. Prod.* 48, 725-738 (1985).
- 30 KUTCHAN, T.M.; DITTRICH, H.; BRACHER, D.; ZENK, M.H.: Enzymology and molecular biology of alkaloid biosynthesis. *Tetrahedron* 47, 5945-5954 (1991).
- 31 ZENK, M.H.; EL-SHAGI, H.; ARENS, H.; STÖCKIGT, J.; WEILER, E.W.; DEUS, B.: Formation of the indol alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In: *Plant Tissue Culture and its Biotechnological Application, Proceedings in Life Science*. BARZ, W.; REINHARD, E.; ZENK, M.H. (Eds.), Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York (1977).
- 32 STÖCKIGT, J.: Biosynthesis in *Rauwolfia serpentina*, Modern aspects of an old medicinal plant. In: *The Alkaloids Vol. 47*. CORDELL, G.A. (Ed.), Academic Press, San Diego (1995).
- 33 WINK, M.; HARTMANN, T.: Enzymology of quinolizidine alkaloid biosynthesis. *Stud. Org. Chem.* 20, 511-520 (1985).
- 34 HARTMANN, T.; WITTE, L.: Chemistry, biology and chemoecology of the pyrrolizidine alkaloids. In: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, PELLETIER, S.W. (Ed.), Elsevier Science, Oxford (1995).
- 35 PLUMIER, P.C.: *Nova Plantarum Americanarum Genera*. Parisiis, Apud Joannem Boudot (1703).
- 36 SCHUMANN, K.: Apocynaceae. In: *Die natürlichen Pflanzenfamilien IV, Abt. 2*. ENGLER, A.; PRANTL, K. (Ed.), Leipzig (1895).

-
- 37 CHATERJEE, A.; PAKRASHI, S.C.; WERNER, G.: Some recent developments in the pharmacology of Rauwolfia Alkaloids. In: *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, XIII*, ZECHMEISTER, L.W. (Ed.), 346-443, Springer Verlag, Wien, 1956.
- 38 SAHU, B.N.: Rauwolfias. Vol. I: Botany and Agronomy. Today's and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi (1979).
- 39 SAHU, B.N.: Rauwolfias. Vol. II: Chemistry and Pharmacology. Today's and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi (1979).
- 40 BURMANN, J.: *Thesaurus Zelandicus*, 141 (1737).
- 41 BURMANN, J.: *Plum. Plant. Am. Gen.*, 252 (1755).
- 42 KIRITIKAR, R.K.; BASU, B.P.: *Indian Medicinal Plants* 2, 777-782 (1919).
- 43 GRUPTA, J.C.; DEBT, A.K.: Preliminary observation on the use of *Rauwolfia serpentina* Benth. in the treatment of mental disorder. *Indian Med. Gaz.* 78, 547-552 (1943).
- 44 SIDDIQUI, S.; SIDDIQUI, R.H.: Chemical examination of the roots of *Rauwolfia serpentina* Benth. *J. Indian Soc.* 8, 667-680 (1931).
- 45 MÜLLER, I.M.; SCHLITTLER, E.; BEIN, H.J.: Reserpin, der sedative Wirkstoff aus *Rauwolfia serpentina* Benth. *Experientia* 8, 338 (1955).
- 46 LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; ZIEGLER, A.: Taschenatlas der Pharmakologie, 3. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1996).
- 47 KLEINSORGE, H.: Klinische Untersuchungen über die Wirkungsweise des Rauwolfia-Alkaloids Ajmalin bei Herzrhythmus-Störungen, insbesondere bei Extrasystole. *Med. Klin.* 54, 409-412 (1959).

-
- 48 ROBINSON, R.: Further Observations on the Chemistry of Ajmaline. *Chem. Ind.*, 285-286 (1955).
- 49 WOODWARD, R.B.: Neuere Entwicklungen in der Chemie der Naturstoffe. *Angew. Chemie* 68, 13-20 (1956).
- 50 BARTLETT, M.F.; SKLAR, R.; TAYLOR, W.I.; SCHLITTLER, E.; AMAI, R.L.S.; BEAK, P.; BRINGI, N.V.; WENKERT, E.: Rauwolfia Alkaloids XXXVIII. Stereospecific degradation leading to the absolute configurations and structure of ajmaline, sarpagine and coryantheidine. *J. Am. Chem. Soc.* 84, 622-630 (1961).
- 51 ROBINSON, R.: Die Chemie des Ajmalins. *Angew. Chemie* 69, 40-44 (1957).
- 52 WENKERT, E.; BRINGI, N.V.: A Stereochemical Interpretation of the Biosynthesis of Indole Alkaloids. *J. Am. Soc.* 81, 1474-1481 (1959).
- 53 BARTON, D.H.R.; KIRBY, G.W.; PRAGER, R.H.; WILSON, E.M.: On the origin of the C-1 fragment in the indole alkaloids. *J. Chem. Soc.*, 3990-3994 (1965).
- 54 LEETE, E.: Biogenesis of the Rauwolfia alkaloids I. The incorporation of tryptophan into ajmaline. *J. Am. Chem. Soc.* 82, 6338-6342 (1960).
- 55 BATTERSBY, A.R.; KAPIL, R.S.; MARTIN, I.A., MO, L.: Loganin as a precursor of the indole alkaloids. *J. Chem. Commun.*, 133-134 (1968).
- 56 NAGAKURA, N.; RÜFFER, M.; ZENK, M.H.: The biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids from strictosidine. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 2308-2312 (1979).

-
- 57 THOMAS, R.: A possible biosynthetic relationship between the cyclopentanoid monoterpenes and the indole alkaloids. *Tetrahedron Letters* 16, 544-553 (1961).
- 58 SAHU, B.N. In: *Rauwolfia serpentina – Sarpagandha*. Vol. I, Today's and Tomorrow's Printers and Publishers New Dehli (1979).
- 59 VOLLOSOVICH, A.G.; SAFONOV, V.I.; SAFONOVA, M.P.: Electrophoresis in polyacrylamide gel as a new method for the separation of Rauwolfia alkaloids. I. Separation of alkaloids of *Rauwolfia serpentina* tissue culture and the preparation, raunatin. *Transae, Leningrad Khim.-Farm. Inst.* 21, 192-197 (1967).
- 60 TUKHTASINOV, M.K.; KIRYALOV, N.P.; BUTENKO, R.G.; GRUSHVITSKII, I.V.; GUREVICH, I.Y., NIKITINA, I.K.: Study of the stem culture of *Rauwolfia serpentina*. *Khim. Prir. Soedin.* 1, 122-123 (1977).
- 61 STÖCKIGT, J.; PFITZNER, A.; FIRL, J.: Indole alkaloids from cell suspension cultures of *Rauwolfia serpentina* Benth. *Plant Cell Reports* 1, 36-39 (1981).
- 62 SCHÜBEL, H.; RUYTER, C.M.; STÖCKIGT, J.: Improved production of raucaffricine by cultivated Rauwolfia cells. *Phytochemistry* 28, 491-494 (1989).
- 63 STÖCKIGT, J.; LANSING, A.; FALKENHAGEN, H.; ENDREß, S.; RUYTER, C.M.: Plant cell cultures – a source of novel phytochemicals and enzymes. In: *Plant Tissue Culture and Gene Manipulation for Breeding and Formation of Phytochemicals*, OONO, K. ET AL. (Eds.), NIAR/Japan (1992).

-
- 64 PFITZNER, A.; STÖCKIGT, J.: Polyneuridine aldehyde esterase: an unusually specific enzyme involved in the biosynthesis of sarpagine type alkaloids. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 459-460 (1983).
- 65 PFITZNER, A.; STÖCKIGT, J.: Characterization of polyneuridine aldehyde esterase, a key enzyme in the biosynthesis of sarpagine/ajmaline type alkaloids. *Planta medica* 48, 221-227 (1983).
- 66 PFITZNER, A.; POLZ, L.; STÖCKIGT, J.: Properties of vinorine synthase – the *Rauwolfia* enzyme involved in the formation of the ajmaline skeleton. *Z. Naturforsch.* 41c, 103-114 (1986).
- 67 STÖCKIGT, J.; PFITZNER, A.; KELLER, P.I.: Enzymatic formation of ajmaline. *Tetrahedron Letters* 24, 2485-2486 (1983).
- 68 POLZ, L.; SCHÜBEL, H.; STÖCKIGT, J.: Characterisation of 2 β -(R)-17-O-Acetyljmalan:Acetylesterease – a specific enzyme involved in the Biosynthesis of the *Rauwolfia* alkaloid ajmaline. *Z. Naturforsch.* 42, 333-342 (1987).
- 69 FALKENHAGEN, H.; STÖCKIGT, J.: Enzymatic biosynthesis of vomilenine, a key intermediate of the ajmaline pathway, catalyzed by a novel cytochrome P450 dependent enzyme from plant cell cultures of *Rauwolfia serpentina*. *Z. Naturforsch.* 50c, 45-53 (1995).
- 70 FALKENHAGEN, H.; POLZ, L.; TAKAYAMA, H.; KITAJIMA, M.; SAKAI, S.-I.; AIMI, N.; STÖCKIGT, J.: Substrate specificity of vinorine hydroxylase, a novel membrane bound key enzyme of *Rauwolfia* indole alkaloid biosynthesis. *Heterocycles* 41, 2683-2690 (1995).

-
- 71 KUTCHAN, T.M.; HAMPP, N.; LOTTSPREICH, F.; BEYREUTHER, K.; ZENK, M.K.: The cDNA clone for strictosidine synthase from *Rauwolfia serpentina*. DNA sequence determination and expression in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* 237, 40-44 (1988).
- 72 KUTCHAN, T.M.: Expression of enzymatically active cloned strictosidine synthase from the higher plant *Rauwolfia serpentina*. *FEBS Lett.* 257, 127-130 (1989).
- 73 KUTCHAN, T.M.; BOCK, A.; DITTRICH, H.: Heterologous expression of the plant proteins strictosidine synthase and berberine bridge enzyme in insect cell culture. *Phytochemistry* 35, 353-360 (1994).
- 74 KUTCHAN, T.M.: Strictosidine: from alkaloid to enzyme to gene. *Phytochemistry* 32, 493 (1993).
- 75 STÖCKIGT, J.; RUPPERT, M.: Strictosidine – the biosynthetic key to monoterpenoid indole alkaloids. In: *Comprehensive Natural Products Chemistry*, BARTON, D.H.R.; NAKANISHI, K. (Eds.), Elsevier Science, Oxford, Vol.4, 109-138 (1999).
- 76 WARZECHA, H.; OBITZ, P.; STÖCKIGT, J.: Purification, partial amino acid sequence and structure of the product of raucaffricine-O- β -glucosidase from plant cell cultures of *Rauwolfia serpentina*. *Phytochemistry* 50, 1099-1109 (1999).
- 77 WARZECHA, H.; GERASIMENKO, I.; KUTCHAN, T.M.; STÖCKIGT, J.: Molecular cloning and functional bacterial expression of a plant glucosidase specifically involved in alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry* 54, 657-666 (2000).

-
- 78 DOGRU, E.; WARZECHA, H.; SEIBEL, F.; HAEBEL, S.; LOTTSPEICH, F.; STÖCKIGT, J.: The gene encoding polyneuridine aldehyde esterase of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis in plants is an ortholog of the α/β hydrolase super family. *Eur. J. Biochem.* 267, 1397-1406 (2000).
- 79 LINSMAIER, E.M.; SKOOG, F.: Organic growth factors requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 18, 100-127 (1965).
- 80 BRADFORD, M.M.: A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of dye-binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254 (1976).
- 81 SHAPIRO, A.L.; VINUELA, E.; MAIZEL JR., J.V.: Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 28, 815-820 (1967).
- 82 ORNSTEIN, L.: Disk Electrophoresis I, background and theory. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 321-349 (1964).
- 83 DAVIS, B.J.: *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427 (1964).
- 84 HEUKESHOVEN, J.; DERNICK, R.: Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* 6, 103-112 (1985).
- 85 OBITZ, P.: Enzyme der Ajmalin-Biosynthese aus Zellkulturen von *Rauwolfia serpentina*. Dissertation, Johannes Gutenberg-Universität Mainz (1995).

-
- 86 CLEVELAND, D.W.; FISCHER, S.G.; KIRSCHNER, M.W.; LAEMMLI, U.K.: Peptide mapping by limited Proteolysis in Sodium Dodecyl Sulfate and Analysis by Gel Electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 252, 1102-1106 (1977).
- 87 TAKAHASHI, T.; NAITO, S.; KOMEDA, Y.: Isolation and analysis of the expression of two genes for the 81 kilodalton heat-shock proteins from Arabidopsis. *Plant. Physiol.* 99, 383-390 (1992).
- 88 VAN BREUSEGEM, F.; DE KEYSER, R.; GARCIA, A.; CLAES, B.; GIELEN, J.; VAN MONTAGU, M.; CAPLAN, A.: Heat-inducible rice hsp 82 and hsp 70 are not always co-regulated. *Planta* 193, 57-66 (1994).
- 89 FELSHEIM, R.F., DAS, A.: Structure and expression of a heat shock protein 83 (hsp83) gene of *Pharbitis nil*. *Plant Physiol.* 100, 801-811 (1992).
- 90 MARRS, K.A.; CASEY, E.S.; CAPITANT, S.A.; BOUCHARD, R.A.; DIETRICH, P.S.: Characterisation of two maize HSP90 heat shock protein genes: expression during heat shock, embryogenesis and pollen development. *Dev. Genet.* 14, 27-41 (1993).
- 91 SERGHINI, M.A.; FUCHS, M.; PINCK, M.; REINBOLT, J.; WALTER, B.; PINCK, L.: RNA2 of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. *J. Gen Virol.* 71, 1433-1441 (1990).
- 92 KÖRNIG, T.: Reinigung und Sequenzierung des Enzyms Vinorin-Synthase. Diplomarbeit, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz (1997).
- 93 SLUYTERMAN, L.A.AE.: Chromatofocusing: isoelectric focusing on ion-exchange columns. I. General principles. *J. Chromatogr.* 150, 17-30 (1978).

-
- 94 PFITZNER, A.; STÖCKIGT, J.: Biogenetic link between sarpagine and ajmaline type alkaloids. *Tetrahedron Letters* 24, 5197-5200 (1983).
- 95 KOSKINEN, A.; LOUNASMAA, M.: The sarpagine-ajmaline group of indole alkaloids. In: *Progress in the chemistry of organic natural products*. HERZ, W.; GRISEBACH, H.; KIRBY, G.W. (Eds.) Springer Verlag Wien, New York (1983).
- 96 BARTLETT, M.F.; LAMBERT, B.F.; WERBLOOD, H.M.; TAYLOR, W.I.: Rauwolfia Alkaloids XLIII. A facile ring closure of Deoxyajmalal A to Deoxyajmaline. *J. Am. Soc.* 85, 475-477 (1963).
- 97 LENZ, R.; ZENK, M.H.: Acetyl coenzyme A:salutaridinol-7-O-acetyltransferase from *Papaver somniferum* plant cell cultures. *J. Biol. Chem.* 270, 31091-31096 (1995).
- 98 LENZ, R.; ZENK, M.H.: Closure of the oxide bridge in morphine biosynthesis. *Tetrahedron Letters* 35, 3897-3900 (1994).
- 99 BORN, T.L.; FRANKLIN, M.; BLANCHARD, J.S.: Enzyme-catalyzed acylation of homoserine: mechanistic characterization of the Haemophilus influenzae met2-encoded homoserine transacetylase. *Biochemistry* 39, 8556-8564 (2000).
- 100 DAVIS, J.T.; CHEN, H.H.; MOORE, R.; NISHITANI, Y.; MASAMUNE, S.; SINSKEY, A.J.; WALSH, C.T.: Biosynthetic thiolase from *Zooglea ramigera*. II. Inactivation with haloacetyl CoA analogs. *J. Biol. Chem.* 262, 90-96 (1987).
- 101 ANDRES, H.H.; KOLB, H.J.; SCHREIBER, R.J.; WEISS, L.: Characterization of the active site, substrate specificity and kinetic properties of acetyl-CoA:arylamine N-acetyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta.* 746, 193-201 (1983).

-
- 102 BASHKAR, B.; DEMOLL, E.; GRAHAME, D.A.: Redox-dependent acetyl transfer partial reaction of the acetyl-CoA decarboxylase/synthase complex: kinetics and mechanism. *Biochemistry* 37, 14491-14499 (1998).
- 103 DOSE, K.: Biochemie - Eine Einführung. 5. Auflage, Springer Verlag Berlin, Heidelberg u.a. (1996).
- 104 POMPEO, F.; VAN HEIJENOORT, J.; MENGIN-LECREULX, D.: Probing the role of cysteine residues in glucosamine-1-phosphate acetyltransferase activity of the bifunctional GlmU protein from *Escherichia coli*: site-directed mutagenesis and characterization of the mutant enzymes. *J. Bacteriol.* 180, 4799-4803 (1998).
- 105 ZAIDENZAG, Y.; FITTON, J.E.; PACKMAN, L.C.; SHAW, W.V.: Characterization and comparison of chloramphenicol acetyltransferase variants. *Eur. J. Biochem.* 100, 609-618 (1979).
- 106 BOYER, P.D.: Sulfhydryl and bisulfide groups of enzymes. In: *The enzymes Vol.1: kinetics, thermodynamics, mechanism, basic properties*. BOYER, P.D.; LARDY, H.; MYRBÄCK, K. (Eds.), Academic press New York (1959).
- 107 FRENZEL, T.; ZENK, M.H.: S-Adenosyl-L-Methionine:3'-Hydroxy-N-Methyl-(S)-Coclaurine-4'-O-Methyltransferase, a regio- and stereoselective enzyme of the (S)-Reticuline pathway. *Phytochemistry* 29, 3505-3511 (1990).
- 108 WESTERMEIER, R.: Elektrophorese-Praktikum. Weinheim, New York, Basel: VCH-Verlagsgemeinschaft (1990).

-
- 109 MURRAY, I.A.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V.; CLOSE, T.I. SHAW, W.V.: Nucleotide sequences of genes encoding the type II chloramphenicol acetyltransferases of *Escherichia coli* und *Haemophilus influenzae*, which are sensitive to inhibition by thiol-reactive reagents. *Biochem. J.* 272, 505-510 (1990).
- 110 BAECKER, P.A., WEDDING, R.T.: Purification of serine acetyltransferase, a component of a multienzyme complex, by immunoadsorption and selective dissociation of the complex. *Anal. Biochem.* 102, 16-21 (1980).
- 111 CORDES, C.: persönliche Mitteilung
- 112 SHELUDKO, Y.; GERASIMENKO, I.; UNGER, M.; KOSTENYUK, I.; STÖCKIGT, J.: Induction of alkaloid diversity in hybrid plant cell cultures. *Plant Cell Rep.* 18, 911-918 (1999).
- 113 FAHN, J.; STÖCKIGT, J.: Purification of Acetyl-CoA: 17-O-Acetylindoline 17-O-acetyltransferase from *Catharanthus roseus* leaves. *Plant Cell Rep.* 8, 613-616 (1990).
- 114 POWER, R.; KURZ, W.G.W.; DELUCA, V.: Purification and characterizaion of acetyl coenzyme A:deacetylindoline 4-O-acetyltransferase from *Catharanthus roseus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 279, 370-376 (1990).
- 115 NAKAMURA, K.; HAYAMA, A.; MASADA, M.; FUKISHIMA, K.; TAMURA, G.; *Plant Cell Physiol.* 29, 689-693 (1988).
- 116 WIGLEY, D.B.; DERRICK, J.P.; SHAW, W.V.: The serine acetyltransferase from *Escherichia coli*. Over-expression, purification and preliminary crystallographic analysis. *FEBS Letters* 277, 267-271 (1990).

-
- 117 SHAW, W.V.; LESLIE, A.G.W.: Chloramphenicol acetyltransferase. *Annu. Rev. Biophys. Chem.* 20, 363-386 (1991).
- 118 SHAW, W.V.: Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods Enzymol.* 43, 737-755 (1975).
- 119 ROBERTS, M.; CORNEY, A.; SHAW, W.V.: Molecular characterization of three chloramphenicol acetyltransferases isolated from *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* 151, 737-741 (1982).
- 120 GERASIMENKO, I.; SHELUDKO, Y.; MA, X.; STÖCKIGT, J.: in preparation.
- 121 WELCH, R.W.; Rudolph, F.B.; Papoutsakis, E.T.: Purification and characterisation of the NADH dependent butanol dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 273, 309-318 (1989).
- 122 KOKLITIS, P.; MURPHY, G.; SUTTON, C.; ANGAL, S.: Purification of recombinant human prostomelysin. *Biochem. J.* 276, 217-221 (1991).
- 123 KAWANO, T.; Kozutsumi, Y.; Kawasaki, T.; Suzuki, A.: Biosynthesis of N-glyconeuraminic acid-containing glycoconjugates. Purification and characterisation of the key enzyme of the cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylation system. *J. Biol. Chem.* 269, 9024-9029 (1994).
- 124 MIZUNO, K.; NAKAMURA T.; TAKADA K.; SAKAKIBARA S.; MATSUO H.: A membrane-bound, calcium-dependent protease in yeast α -cell cleaving on the carboxyl side of paired basic residues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 144, 807-814 (1987).

-
- 125 HENDRIKS D.; WANG W.; SCHARPE S.; LOMMAERT M.P.; VAN SANDE M.: Purification and characterisation of a new arginine carboxypeptidase in human serum. *Biochim. Biophys. Acta* 1034, 86-92 (1990).
- 126 CICEK, M.; ESEN, A.: Cloning and sequencing of a cDNA coding for beta-glucosidase (Dhurrinase) from *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Plant Physiol.* 109, 1497-1502 (1995).
- 127 CICEK, M.; ESEN, A.; Expression of soluble and catalytically active plant (monocot) beta-glucosidases in *E. coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 392-400 (1999).
- 128 JOY, R.W.; SUGIYAMA, M.; FUKUDA, H.; KOMAMINE, A.: Cloning and characterization of polyphenol oxidase cDNAs of *Phytolacca americana*. *Plant Physiol.* 107, 1083-1089 (1995).
- 129 CHEN, X.-Y.; WANG, M.; CHEN, Y.; DAVISSON, J.; HEINSTEIN, P.: Cloning and heterologous expression of a second (+)- δ -cadinene synthase from *Gossypium arboreum*. *J. Nat. Prod.* 59, 944-951 (1996).
- 130 ST-PIERRE, B.; LAFLAMME, P.; ALARCO, A.M.; DE LUCA, V.: The terminal O-acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent acyl transfer. *Plant J.* 14, 703-713 (1998).