



Heterologe Expression und physikochemische Charakterisierung der
Polyphenoloxidasen aus dem Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera*)

Dissertation

zur Erlangung des Grades

"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

Even Solem

geb. am 12.11.1978 in Hamburg

Mainz, 2017

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 04.07.2017

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung.....	1
1.	Typ 3-Kupferproteine	1
1.1	Tyrosinasen und Catecholoxidasen	3
1.2	Phylogenie der Typ 3-Kupferproteine	4
2.	Die Polyphenoloxidasen der Pflanzen	6
2.1	Strukturmerkmale pflanzlicher PPOs	7
2.2	Die Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von VvPPOg aus <i>V. vinifera</i>	10
3.	Ziel der Arbeit	12
B	Material und Methoden	13
1.	Chemikalien	13
2.	Geräte und Hilfsmittel	13
2.1	Geräte	13
2.2	Chemisch kompetente Bakterienstämme	15
2.3	Plasmidvektoren	15
2.4	Nährmedien und Agarplatten	15
2.5	Antibiotika	17
2.6	Verwendete Enzyme	17
2.7	Reagenzienkits	17
2.8	DNA- und Protein-Marker	18
3.	Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen	18
4.	Mikrobiologische Methoden	18
4.1	Nährmedien	18
4.2	Plattenkulturen	19
4.3	Flüssig- und Vorkulturen	19
4.4	Produktionskulturen	19
4.5	Glycerinkulturen	20
5.	Molekularbiologische Methoden	20
5.1	Gewebematerial für die RNA-Gewinnung	20
5.2	RNA-Extraktion	20
5.3	RT-PCR	21
5.4	Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels UV/Vis-Spektroskopie	22
5.5	Primer-Design	22
5.5.1	Sequenzspezifische Primer	23

5.5.2	Primer für die Herstellung der L-VvPPOcs-2- und L-VvPPOcs-3 Expressionskonstrukte	23
5.6	Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
5.6.1	Optimierung der PCR-Reaktionen	24
5.7	PCR-Methoden	25
5.7.1	<i>Touchdown</i> -PCR.....	26
5.7.2	Ortsgerichtete Mutagenese	27
5.7.2.1	Ortsgerichtete Mutagenese mittels inverser PCR.....	27
5.7.2.2	Ortsgerichtete Mutagenese mittels <i>In-Fusion™</i> Klonierung	28
5.7.3	Kolonie-PCR	29
5.8	PCR-Aufreinigung.....	30
5.9	Elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren.....	30
5.10	Extraktion der DNA aus Agarosegelen	32
5.11	Klonierung	33
5.11.1	Klonierung von PCR-Produkten	33
5.11.2	Die TA-Klonierung.....	33
5.11.3	Die gerichtete Klonierung.....	33
5.11.3.1	Spezifische DNA-Fragmentierung mittels Typ-II-P-Restriktionsendonukleasen	33
5.11.3.2	Dephosphorylierung des pET-51b(+)-Vektors	34
5.11.3.3	Ligation mittels T4-DNA-Ligase.....	35
5.12	Transformation chemisch kompetenter Bakterien	35
5.12.1	Transformation chemisch kompetenter Bakterien mittels Hitzeschock.....	36
5.12.2	Blau-Weiß-Selektion	36
5.13	Isolierung von Plasmid-DNA	37
5.14	Sequenzanalyse	37
5.14.1	Computergestützte Sequenzanalyse.....	37
5.14.2	Sequenzierung mit vektorspezifischen Primern.....	38
5.14.3	Verwendete Programme und Datenbanken	38
6.	Bioinformatische Methoden	38
6.1	Homologiemodellierung (MODELLER).....	38
6.2	Chimera	39
7.	Rekombinante Expression	39
7.1	Rekombinante Expression von Fusionsproteinen in <i>E. coli</i>	39
7.1.1	Rekombinante Expression mittels pTrcHis-TOPO® TA und pTrcHis2-TOPO® TA Vektor	40
7.1.2	Rekombinante Expression mittels pET-51b(+) Vektor	42
8.	Proteinbiochemische Methoden.....	43

8.1	Aufreinigung der rekombinanten Proteine mittels Affinitätschromatographie	43
8.1.1	Reinigung der nativen His-Fusionsproteine mittels Immobilisierte-Metallionen - Affinitätschromatographie (IMAC)	43
8.1.2	Reinigung der nativen rekombinanten Proteine mittels Strep-Tactin Affinitätschromatographie	44
8.3	Anreicherung von Proteinen durch Ultrafiltration	46
8.4	Spektroskopische Methoden.....	46
8.4.1	Quantifizierung von Proteinen mittels UV/Vis-Spektroskopie.....	46
8.4.2	Circulardichroismus-Spektroskopie.....	46
8.5	Polyacrylamidgelelektrophorese.....	47
8.5.1	Diskontinuierliche SDS-PAGE.....	47
8.5.2	Native PAGE.....	49
8.5.3	Nachweis der Diphenolase- und Monophenolase-Aktivität	50
8.5.4	Coomassie-Färbung	50
8.6	Western Blot.....	51
8.6.1	Transfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen	51
8.6.2	Antikörper für die Immunodetektion.....	51
8.6.2.1	6xHis-Tag monoklonaler Antikörper.....	51
8.6.2.2	Strep-Tag® II monoklonaler Antikörper.....	51
8.7	Immunodetektion.....	52
8.8	Dokumentation der SDS-Gele und Western Blots.....	52
8.9	Kinetik-Messungen	53
8.10	Bestimmung der pH-Optima	54
C	Ergebnisse.....	56
1.	Sequenzierung und rekombinante Expression dreier PPO Isoformen von <i>Vitis vinifera</i> L. cv. Cabernet Sauvignon	56
1.1	Amplifizierung, Klonierung und Identifizierung der cDNA-Fragmente	56
1.2	Sequenzanalyse von L-VvPPOcs-1, L-VvPPOcs-2 und L-VvPPOcs-3.....	60
1.3	Rekombinante Expression von VvPPOcs-1 und VvPPOcs-2 in <i>E. coli</i>	61
1.3.1	Rekombinante Expression der N-terminalen Domäne von VvPPOcs-1 mit N- terminalem His-Tag	61
1.3.2	Rekombinante Expression der N-terminalen Domäne von VvPPOcs-1	64
1.3.3	Rekombinante Expression des latenten L-VvPPOcs-2 und L-VvPPOcs-3 mit N- terminalem Strep-Tag II.....	66
1.3.4	Detektion der enzymatischen Aktivität von L-VvPPO-2 und L-VvPPOcs-3	67
1.3.5	Bestimmung der pH Optima von L-VvPPOcs-2 beim katalytischen Umsatz von 4- Methylcatechol in An- und Abwesenheit des Aktivators SDS	70

2.	Auswirkung des <i>Gate-Residues</i> auf die katalytische Aktivität des rekombinanten L-VvPPOcs-2.....	72
2.1	Ortsgerichtete Mutagenese am Gate-Residue.....	73
2.2	Rekombinante Expression der F259-Muteine.....	74
2.3	Enzymkinetik der Diphenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2-Wildtyps und der F259-Muteine	75
2.4	Enzymkinetik der Monophenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2-Wildtyps und der F259-Muteine	77
2.5	Circulardichroismus-Spektroskopie.....	79
3.	Fixierung eines Wassermoleküls in der Proteinmatrix durch zwei konservierte Aminosäuren	80
3.1	Ortsgerichtete Mutagenese: Herstellung dreier Muteine	81
3.2	Rekombinante Expression der Muteine	83
3.3	Nachweis und zeitlicher Zuwachs der Katalyse von Mono- und Diphenolen	84
D	Diskussion.....	87
1.	Rekombinante Expression einer latenten pflanzlichen PPO mit ausgeprägter Monophenolase-Aktivität	87
2.	Strukturelemente am aktiven Zentrum von Typ 3-Kupferproteinen welche die Katalyse beeinflussen	88
2.1	Das <i>Gate-Residue</i> : Ein Kriterium für die Suppression der Monophenolase-Aktivität bei Catecholoxidasen?.....	89
2.2	Thioether eine strukturelle Besonderheit von Typ 3-Kupferproteinen	94
2.3	Aminosäurereste mit Platzhalter-Funktion	97
3.	Einfluss zweier konservierter Aminosäuren auf die Mono- und Diphenolase-Aktivität.....	101
4.	Hypothetischer Deprotonierungsmechanismus der Monophenole	106
E	Zusammenfassung.....	110
F	Literatur.....	111
G	Anhang	121
	Abkürzungen	121
1.1	Allgemeine Abkürzungen	121
1.2	IUPAC-Code der Nukleinsäuren.....	123
1.3	Abkürzungen und IUPAC-Code der Aminosäuren	124
1.4	Verwendete PPO-Abkürzungen.....	124
1.5	Verzeichnis der verwendeten Kristallstrukturen.....	126
2.	Verwendete Primer	127
3.	Internetadressen	128
4.	Vektorkarten der verwendeten Expressionskonstrukte	130
4.1	Vektorkarte des VvPPOcs-1-N-term_pTrcHis-Konstrukts	130

4.2	Vektorkarte des VvPPOcs-1-N-term + Linker_pTrcHis-Konstrukts.....	131
4.3	Vektorkarte des VvPPOcs-1-N-term_Strep-Tag II_pTrcHis2-Konstrukts.....	132
4.4	Vektorkarte des L-VvPPOcs-2_pET-51b(+)-Konstrukts.....	133
4.5	Vektorkarte des L-VvPPOcs-3_pET-51b(+)-Konstrukts.....	134
	Danksagung	135
	Lebenslauf	136
	Erklärung	138

A Einleitung

1. Typ 3-Kupferproteine

Als Kofaktor bestimmter Metalloproteine ist das Übergangsmetall Kupfer (Cu) an zahlreichen enzymatischen Prozessen beteiligt. Entscheidend für die funktionelle Vielfalt dieser Proteine ist die Eigenschaft des Kupfers reversibel zwischen zwei diskreten Valenzzuständen zu wechseln, wobei Cu^+ (Cu(I)) als reduzierte und Cu^{2+} (Cu(II)) als oxidierte Form vorliegen. Während Cu(I) in der Proteinmatrix vorzugsweise durch Thiole und Thioether (Cysteine, Methionine) koordiniert wird, besitzt Cu(II) erhöhte Affinität zu Carboxyl-Sauerstoff-Liganden der Salze von Asparagin- und Glutaminsäure bzw. zu Stickstoff-Liganden der Imidazolsysteme von Histidinen (Magnus et al., 1994; Koch et al., 1997; Festa und Thiele, 2011). Kupferhaltige Proteine kommen in den drei Domänen des zellulären Lebens vor und werden nach ihren spektroskopischen Eigenschaften und der topologischen Charakteristika ihrer aktiven Zentren in drei Klassen unterteilt (Typ-1-3):

Typ 1–Kupferproteine wie Halocyanin, Nitrit-Reduktase und Plastocyanin sind blaue einkernige Kupfer-Proteine und als Elektronentransporter an diversen physiologischen Redoxprozessen beteiligt. (Nar et al., 1991; Scharf und Engelhard, 1993; Mattar et al., 1994; Bagby et al., 1994; Godden et al., 1991; Dodd et al., 1997).

Typ 2-Kupferproteine besitzen ebenfalls ein einkerniges Kupferzentrum mit einer sehr schwachen Absorption im sichtbaren Bereich, wodurch sie weitgehend farblos erscheinen. Zu den prominentesten Vertretern zählt die Oxidoreduktase Galactoseoxidase (McGrath et al., 2011).

Typ 3-Kupferproteine sind ubiquitär verbreitet und zeichnen sich durch zweikernige Kupferzentren aus. Die beiden antiferromagnetisch gekoppelten Kupfer-Ionen (CuA und CuB) binden im oxygenierten Dikupfer(II)-Peroxo-Zentrum molekularen Sauerstoff als Peroxid in einer *side-on* Verbrückung (μ - η^2 : η^2), wie es für ein anorganisches Modellsystem gezeigt wurde (Kitajima et al., 1992). Die beiden Kupfer-Ionen sind in Typ 3-Kupferproteinen über jeweils drei Histidine ($\text{H}_{\text{A}1}$, $\text{H}_{\text{A}2}$, $\text{H}_{\text{A}3}$ bzw. $\text{H}_{\text{B}1}$, $\text{H}_{\text{B}2}$, $\text{H}_{\text{B}3}$) mit der Proteinmatrix verbunden, welche von einem hoch konservierten „4- α -Helix-Bündel-Motiv“ bereitgestellt werden (siehe Abb. 1) (Gaykema et al., 1984; Volbeda und Hol, 1989; Magnus et al., 1994; Klabunde et al., 1998; Cuff et al., 1998; Perbandt et al., 2003; Jaenicke und Decker., 2004;

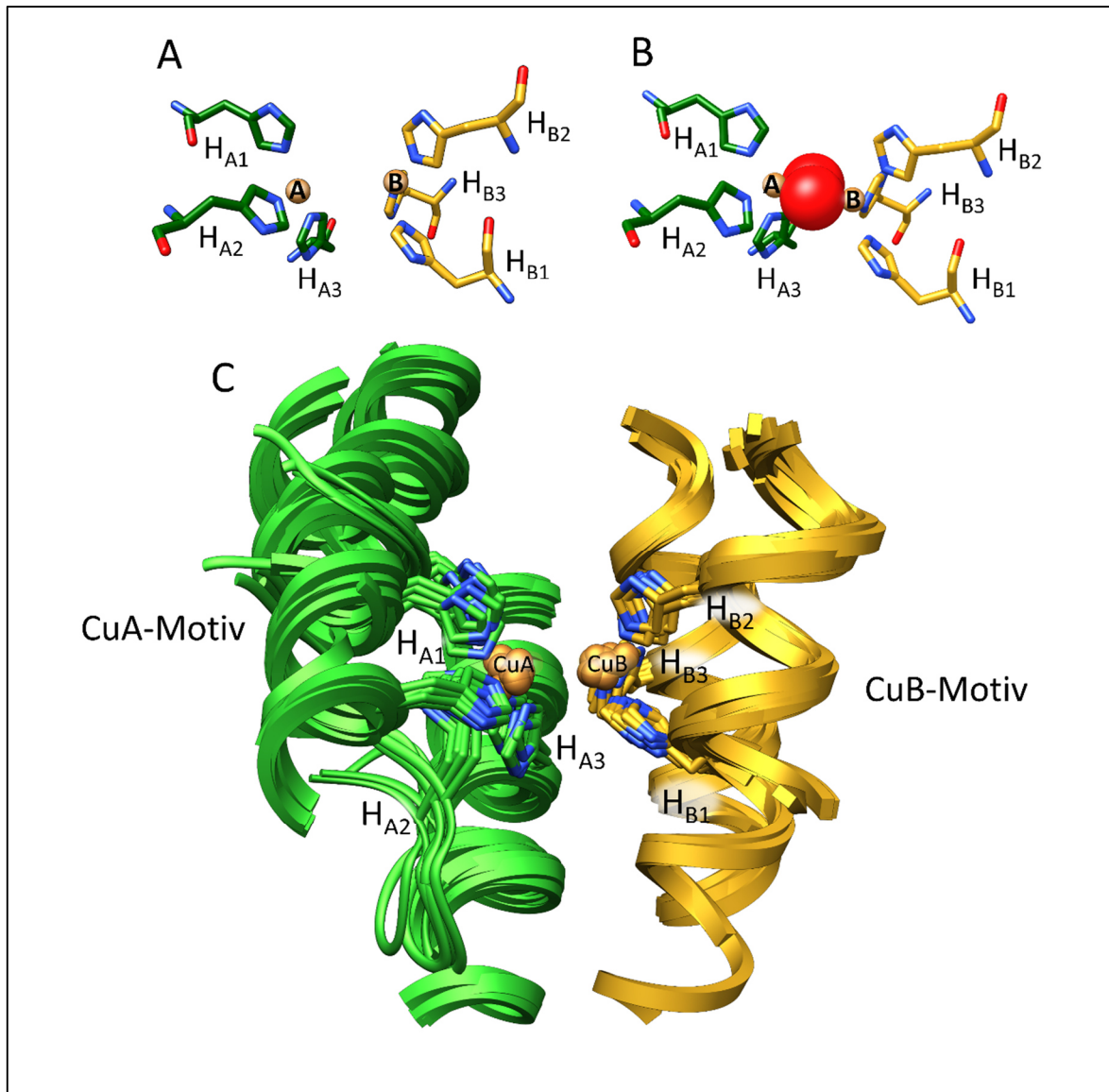


Abb. 1: Struktureller Aufbau der Dikupfer-Zentren von Typ 3-Kupferproteinen. (A) und (B) zeigen die Komplexe im deoxygenierten Dikupfer(I)- und oxygenierten Dikupfer(II)-Peroxo-Zustand eines Hämocyanins aus *L. polyphemus* (PDB-IDs: 1LLA und 1NOL). Dargestellt sind die beiden Cu-Ionen (CuA und CuB, beige), welche jeweils von drei konservierten Histidinen H_{A1}, H_{A2} und H_{A3} (grün) bzw. H_{B1}, H_{B2} und H_{B3} (gelb) koordiniert werden. Im oxygenierten Zustand (B) wird ein Sauerstoffmolekül als Peroxid (sphärische Darstellung, rot) in einer *side-on* Koordination zwischen den beiden Cu-Ionen verbrückt. Die Histidine der CuA- und CuB-Motive werden in den meisten bekannten Fällen von jeweils zwei antiparallelen α -Helices (CuA-Motiv, grün; CuB-Motiv, gelb) bereitgestellt. Die Superposition in Teilbild (C) verdeutlicht die hohe Konservierung des „4- α -Helix-Bündel-Motivs“ in Typ 3-Kupferproteinen unterschiedlichster Organismen (PDB-IDs: 1HCY, HC, *P. interruptus*; 1LLA, HC, *L. polyphemus*; 1JS8, HC, *O. dofleini*, 1WX3, TY, *S. castaneoglobisporus*; 3W6W, TY, *A. orycae*; 4J3R, CO, *A. orycae*; 2Y9W, TY, *A. bisporus*; 3HHS, pPO, *M. sexta*; 3WKY, pPO, *M. japonicus*; 1BT3, PPO, *I. batatas*; 2P3X, PPO, *V. vinifera*).

Matoba et al., 2006; Li et al., 2009; Virador et al., 2010; Sendovski et al., 2011; Solomon et al., 2014). Obwohl Typ 3-Kupferproteine in Bezug auf ihre aktiven Zentren strukturell hoch konserviert sind, stellen sie auf Primärstrukturebene eine sehr heterogene Gruppe mit teilweise erheblichen Unterschieden in Aufbau und Gestalt ihrer Tertiär- und Quartärstrukturen dar (Markl 1986, van Holde und Miller, 1995; van Gelder et al., 1997; Decker und Tuczek, 2000; Lieb et al., 2001; Jaenicke und Decker, 2004; Marusek et al., 2006; Markl, 2013, Gai et al., 2015). Besonders unmittelbar am aktiven Zentrum scheinen Veränderungen in der Aminosäureabfolge, Substratinteraktionen mit der

Proteinmatrix und daraus resultierende Substratspezifitäten bzw. den Substratzutritt zu modulieren und könnten somit signifikanten Einfluss auf die Funktionalität der Proteine haben (Klabunde et al., 1998; Decker und Tuczec, 2000; van Holde et al., 2001; Jaenicke und Decker, 2004; Marusek et al., 2006; Goldfeder et al., 2013; Goldfeder et al., 2014; Kanteew et al., 2015; Naresh et al., 2015; Bijelic et al., 2015; Molitor et al., 2016). Solche Differenzierungen könnten auch eine mögliche Erklärung für die enorme Diversifikation in ein breites Spektrum verschiedenster biologischer Prozesse sein. So können Typ 3-Kupferproteine bei Metazoen als respiratorische Sauerstofftransporter dienen (Mollusken und Arthropoden), Teil des angeborenen Immunsystems sein, wichtige Aufgaben bei der Wundheilung und Sklerotisierung übernehmen sowie die Melaninsynthese initiieren (Linzen et al., 1985; van Holde und Miller, 1995; Sugumaran 1991; Söderhäll und Cerenius 1998; Sugumaran et al., 2002; Garcia-Borron und Solano, 2002; Olivares et al., 2009; Coates et al., 2011, Coates und Nairn, 2014). In pflanzlichen Systemen können diese Proteine neben ähnlichen Funktionen auch wirksamen Schutz gegen Fraßfeinde und mikrobiellen Befall bieten (Mayer und Harel, 1979; Constabel et al., 1995; Karban et al., 2000; Mayer, 2006). Typ 3-Kupferproteine werden nach ihrer spezifischen physiologischen Funktion entweder in die enzymatischen Tyrosinasen (TY), Tyrosinase-verwandte Proteine (TRP), Prophenoloxidasen (pPO), Polyphenoloxidasen [PPO, Catecholoxidase (CO)] und Laccasen oder in die respiratorischen Hämocyanine der Arthropoden und Mollusken unterteilt (Mason et al., 1948; Mayer und Harel, 1979; Linzen et al., 1985; Cohen et al., 1990; Aspán und Söderhäll, 1991; Tsukamoto et al., 1992; Kawabata et al., 1995; van Holde und Miller, 1995; van Holde et al., 2001; Claus et al., 2002). Die Hämocyanine der Invertebraten vermitteln hauptsächlich den Transport von molekularem Sauerstoff und sind in der Regel nicht enzymatisch aktiv (Bonaventura und Bonaventura, 1980). Sie können aber *in vitro* durch Zugabe spezifischer Aktivatoren [SDS (Natriumdodecylsulfat) und anionische Phospholipide] sowie durch limitierte Proteolyse in die oben genannten enzymatischen Formen konvertiert werden (Decker und Rimke, 1998; Decker et al., 2001; Cong et al., 2009; Coates et al., 2011).

1.1 Tyrosinasen und Catecholoxidasen

Tyrosinasen, die meisten Tyrosinase-verwandten Proteine und Catecholoxidasen, katalysieren den Umsatz phenolischer Substrate und werden daher im Allgemeinen auch als Phenoloxidasen bezeichnet. Die erwähnten Tyrosinasen vermitteln die Katalyse von Mono- und Diphenolen (Mason et al., 1948, Toussaint und Lerch, 1987). Dabei werden die Monophenole in Gegenwart von molekularem Sauerstoff (O₂) zu den korrespondierenden *o*-Chinonen umgesetzt (Monophenolase- oder Cresolase – Aktivität, siehe Abb. 2). Die damit verbundene *ortho*-Hydroxylierung der monophenolischen Substrate und die anschließende Oxidation (Transfer von zwei Elektronen), erfolgen in einem Schritt, so dass sich keine *o*-Diphenole als Zwischenprodukte anreichern können (Naish et al., 1988; Naish-Byfield und

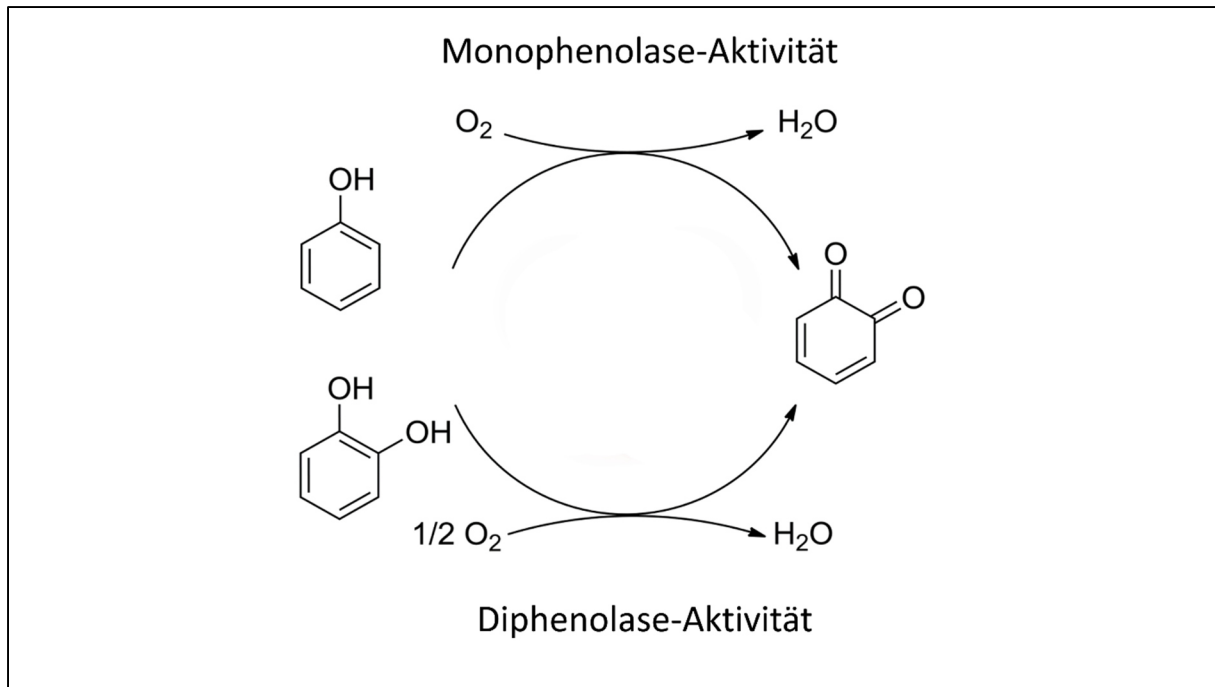


Abb.2: Mono- und Diphenolase-Aktivität von Tyrosinasen und Catecholoxidasen. In Abhängigkeit von der Präsenz des Kosubstrats O_2 , katalysieren Tyrosinasen die *ortho*-Hydroxylierung von Monophenolen (Cresolase-Aktivität) und die Oxidation zu den korrespondierenden *o*-Chinonen in einem Schritt. Dagegen vermitteln Catecholoxidasen ausschließlich die Oxidation der *o*-Diphenole zu den entsprechenden *o*-Chinonen (nach Solem et al., 2016 und Rolff et al., 2011)

Riley, 1992; Sánchez-Ferrer et al., 1995). Die erwähnten Catecholoxidasen hingegen, katalysieren lediglich den zweiten Oxidationsschritt (Diphenolase- oder Catecholoxidase-Aktivität) und sind daher ausschließlich in der Lage *o*-Diphenole umzusetzen (Mayer und Harel, 1979, Sánchez-Ferrer et al., 1995; Decker et al., 2006). Aus den gebildeten hoch reaktiven Chinonen gehen anschließend autokatalytisch Melanin-Pigmente hervor (Sugumaran, 1991; Sánchez-Ferrer et al., 1995; Sugumaran, 2002; Weijn et al., 2013).

1.2 Phylogenie der Typ 3-Kupferproteine

Phylogenetische Analysen weisen darauf hin, dass sich die Gesamtheit der rezenten Typ 3-Kupferproteine auf einen gemeinsamen ancestralen Ursprung zurückführen lässt (Aguilera et al., 2013). Wahrscheinlich evolvierten erste Tyrosinase-ähnliche Proteine bereits erdgeschichtlich frühzeitig in Organismen, die einer weitgehend reduzierenden Atmosphäre ausgesetzt waren (van Holde et al., 2001; Jaenicke und Decker 2004; Aguilera et al., 2013). Vermutlich boten diese Proteine zunächst Schutz vor der cytotoxischen Wirkung von reaktivem Sauerstoff (van Holde et al., 2001; Jaenicke et al., 2004).

Im Allgemeinen kann die evolutionäre Entwicklung der Typ 3-Kupferproteine als hoch dynamischer Prozess beschrieben werden, welcher durch multiple und unabhängige, linienspezifische Genduplikations- und Genexpansionsereignisse sowie differenziellen Genverlusten gekennzeichnet ist

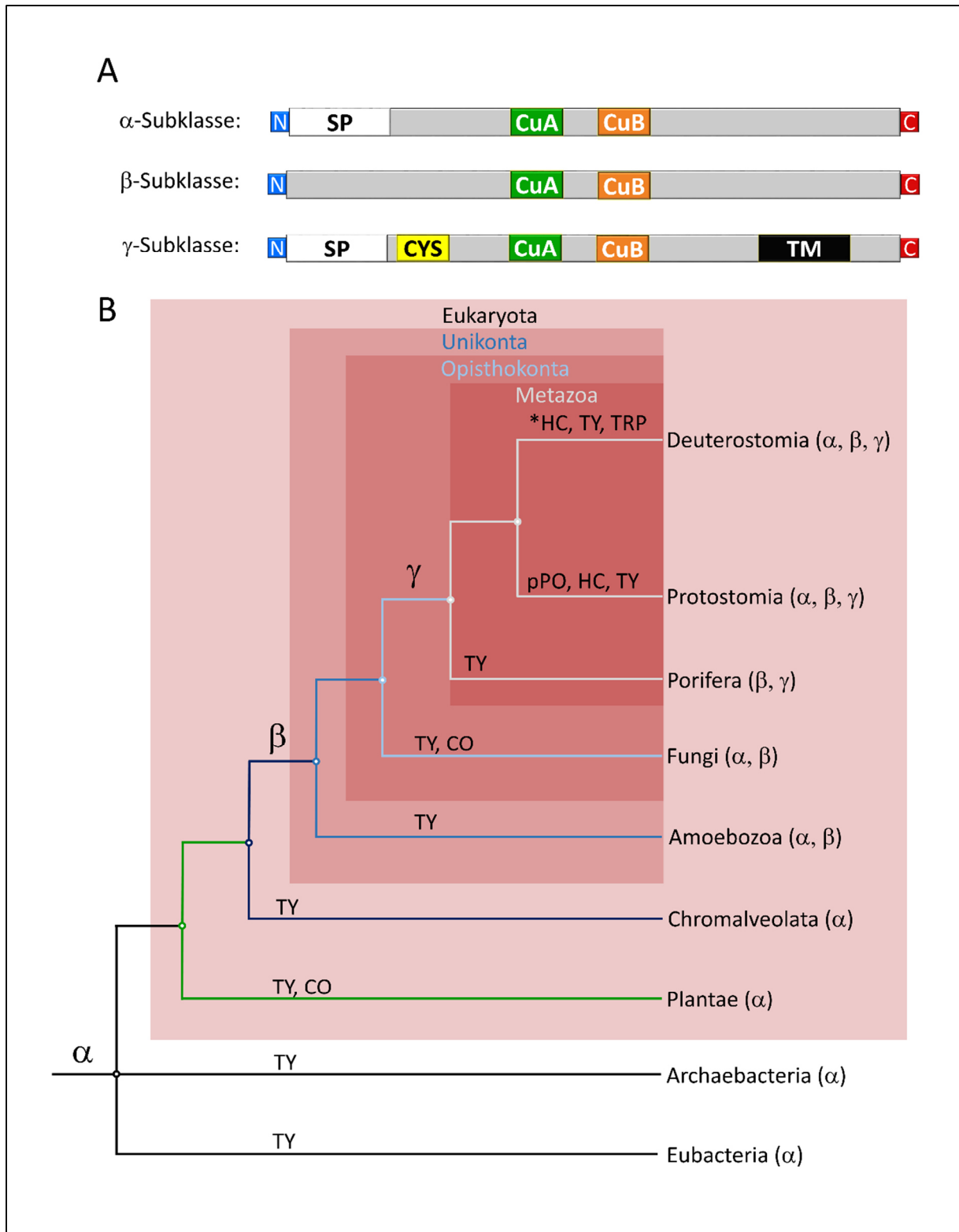


Abb.3: Vereinfachte Darstellung des phylogenetischen Ursprungs der rezenten Typ 3-Kupferproteine nach Aguilera et al. (2013). (A) Domänenstruktur der α -, β und γ -Subklassen. Als ursprünglichste Formen der Typ 3-Kupferproteine besitzen Vertreter der α -Typen neben den konservierten Cu-Motiven (CuA, grün; CuB, orange) zusätzlich N-terminale (N-Terminus, blau) Signal-Peptide (SP), welche die Sekretion der Proteine vermitteln. Sie finden sich ubiquitär in den drei Domänen des Lebens. Zu ihnen zählen HCs, TYs, pPOs und COs. Die Proteine der β -Subklasse kommen *in vivo* intrazellulär vor und zeichnen sich durch die Abwesenheit spezifischer N-terminaler Signal-Peptide aus. Formen der γ -Unterklasse leiten sich wahrscheinlich von Genen des α -Typs ab. Zu diesen werden z.B. die TRPs der Mammalia (Deuterostomia) gezählt. Als Membranproteine sind sie durch definierte Transmembrandomänen (TM, schwarz) in den jeweiligen C-terminalen Domänen (C-Terminus, rot) charakterisiert. Zudem besitzen sie stromaufwärts vom CuA-Motiv ein weiteres Cystein-reiches Motiv (CYS, gelb). Die Metazoen stellen die einzige phylogenetische Gruppe dar, bei welcher bisher alle drei Unterklassen identifiziert werden

konnten. (B) Vereinfachte phylogenetische Repräsentation des evolutionären Ursprungs der Typ-3 Kupferproteine in den drei Domänen des Lebens verändert nach Aguilera et al. (2013). Hiernach leiten sich alle Gene der rezenten Typ 3-Kupferproteine von Genen der α -Subklasse ab. (*HC = Hämocyanin von *C. intestinalis* als bisher einzig bekanntes Hämocyanin unter Vertretern der Deuterostomia)

(Tran et al., 2012; Aguilera et al., 2013; Martin-Duran et al., 2013). Nach Aguilera et al. (2013) erlauben die durchgeführte phylogenetischen Analysen und der Vergleich der Domänenstrukturen verschiedener Typ 3-Kupferproteine (siehe Abb. 3) eine Unterteilung in 3 Subklassen (α , β und γ). Die Vertreter der α -Subklasse verfügen als sekretorische Proteine über N- terminale Signalpeptide. Zu diesen zählen u.a. die pflanzlichen PPOs, bakterielle Tyrosinasen und Hämocyanine der Mollusken. Die Hämocyanine der Invertebraten entwickelten sich höchstwahrscheinlich in den Linien der Arthropoden und Mollusken unabhängig voneinander und differenzierten sich aus Genen, deren Produkte vermutlich Tyrosinase-Aktivität besaßen (Kawabata et al., 1995; Burmester und Scheller, 1996; van Holde et al., 2001; Burmester, 2002; Martin-Duran et al., 2013). Gene der β -Unterklasse leiten sich offenbar von ancestralen α -Genen ab und könnten sich noch vor der Abspaltung der Linien von eukaryotischen Unikonten durch Genduplikations- und Genexpansionsereignisse differenziert haben (Aguilera et al., 2013). Diese intrazellulären Typ 3-Kupferproteine wurden bisher bei Amoebozoen, Pilzen und den Metazoen beschrieben (Gasparetti et al., 2010; Aguilera et al., 2013). Proteine der dritten γ -Subklasse zeichnen sich durch den Besitz eines N-terminalen Signal-Peptids und einer definierten Transmembrandomäne aus. Zudem besitzen sie im Bereich der katalytischen Tyrosinase-Domäne ein Cystein-reiches Motiv (siehe Abb. 3, A). Die entsprechenden Gene scheinen durch weitere Genduplikations- und Expansionsereignisse noch vor der Diversifikation der Metazoenlinien aus Genen des α -Typs hervorgegangen zu sein (Aguilera et al., 2013). Zu diesen werden beispielsweise die humanen TRPs gezählt, konnten aber auch basal in den Linien der Porifera identifiziert werden (Müller et al., 2004; Aguilera et al., 2013).

2. Die Polyphenoloxidasen der Pflanzen

Pflanzliche Polyphenoloxidasen (PPOs) sind von großem wirtschaftlichem Interesse, da sie für die enzymatische Bräunung von Obst, Gemüse und Pilzen beim Transport sowie der Lagerung verantwortlich gemacht werden, wodurch der Marktwert dieser Agrarerzeugnisse sinkt (Martinez und Whitaker, 1995, Whitaker und Chang 1995; Nicolas et al.,1994; Yoruk und Marshall, 2003). Daher liegt der Fokus vieler Studien auf der Identifizierung neuer spezifischer Inhibitoren und der Erforschung spezieller Mechanismen, welche die unerwünschte Melaninbildung verhindern können (Rescigno et al., 2002; He et al., 2008; Mogol et al., 2010, Hemachandran et al., 2017). Zudem ist der potentielle Beitrag von PPOs beim Erwerb spezifischer Krankheitsresistenzen und der PPO-induzierte Schutz gegen Herbivoren, Gegenstand aktueller Forschung (Bosch et al., 2014; Fuerst et al., 2014; Gajera et al., 2015; Asghari und Hasanlooe, 2016; Liang et al., 2017).

Weitere Aspekte, insbesondere in der Grundlagenforschung, sind die spezifischen enzymatischen Reaktionen, die von den PPOs katalysiert werden. Hierzu konnte bereits in frühen Arbeiten festgestellt werden, dass pflanzliche PPOs zwar sehr effizient Catechole umsetzen können, jedoch oftmals über keine Monophenolase-Aktivität verfügen (Mayer und Harel, 1979; Pérez-Gilabert et al., 2000; Mayer et al., 2006). Auf Grundlage von gelösten Röntgenkristallstrukturen wurden in der Vergangenheit zahlreiche konservierte Strukturmerkmale diskutiert, welche einen direkten Einfluss auf die spezifischen, enzymatischen Reaktionen haben könnten und somit eine Unterscheidung von Tyrosinasen und Catecholoxidasen auf molekularer Ebene erlauben könnten (Klabunde et al., 1998; Eicken et al., 1999, Matoba et al., 2006; Decker et al., 2007, Fujieda et al., 2013; Goldfeder et al., 2013). Jedoch konnten bisher keine der aufgestellten Hypothesen experimentell bestätigt werden.

2.1 Strukturmerkmale pflanzlicher PPOs

Bislang wurde im Rahmen von Sequenzierungsarbeiten sowie Genom- und Transkriptom-Analysen eine enorme Vielfalt an Primärstrukturdaten von pflanzlichen PPOs generiert. Die Informationen über den allgemeinen strukturellen Aufbau dieser Proteine stammen überwiegend aus 3D-rekonstruierten Röntgenkristallstrukturen sowie aus vergleichenden Sequenzanalysen und konnten durch Sekundärstrukturvorhersagen und Homologiemodelle ergänzt werden (Klabunde et al., 1998; Gerdemann et al., 2002a; Marusek et al., 2006; Decker et al., 2007; Virador et al., 2010; Dirks-Hofmeister et al., 2012; Dirks-Hofmeister et al., 2014; Bijelic et al., 2015; Molitor et al., 2016). Als erste Kristallstruktur einer pflanzlichen PPO konnte zunächst die prozessierte N-terminale Domäne (katalytische Tyrosinase-Domäne) einer Catecholoxidase aus der Süßkartoffel *I. batatas* (*IbCO-1*; PDB-ID: 1BT3) mit einer Auflösung von 2,5 Å gelöst werden (Klabunde et al., 1998). Die vorgestellten strukturellen Charakteristika wurden durch weitere Kristallstrukturen von PPOs aus dem Wein *V. vinifera* (PDB-ID: 2P3X), der Walnuss *J. regia* (PDB-ID: 5CE9) und dem Großblütigen Mädchenauge *C. grandiflora* (*CgAUS1*, PDB-ID: 4Z12) gestützt (Virador et al., 2010; Bijelic et al., 2015; Molitor et al., 2016). Bei letztgenannter (*CgAUS1*) handelt es sich um eine homologe Aureusidin Synthase, für welche es erstmalig gelang eine Röntgenkristallstruktur einer vollständigen latenten PPO zu gewinnen (siehe Abb. 4) (Molitor et al., 2016).

Pflanzliche PPOs werden als latente Vorläufer-Proteine synthetisiert und besitzen N-terminale Transitpeptide (TP). Diese vermitteln den aktiven Transport in das Thylakoidlumen von Chloroplasten (Sommer et al., 1994; Koussevitzky et al., 1998; Koussevitzky et al., 2008, Boeckx et al., 2015). Nach erfolgtem Import setzen sich die reifen latenten PPOs aus einer definierten Abfolge von drei konservierten funktionellen Bereichen zusammen (Abb. 4, A) (van Gelder et al., 1997, Marusek

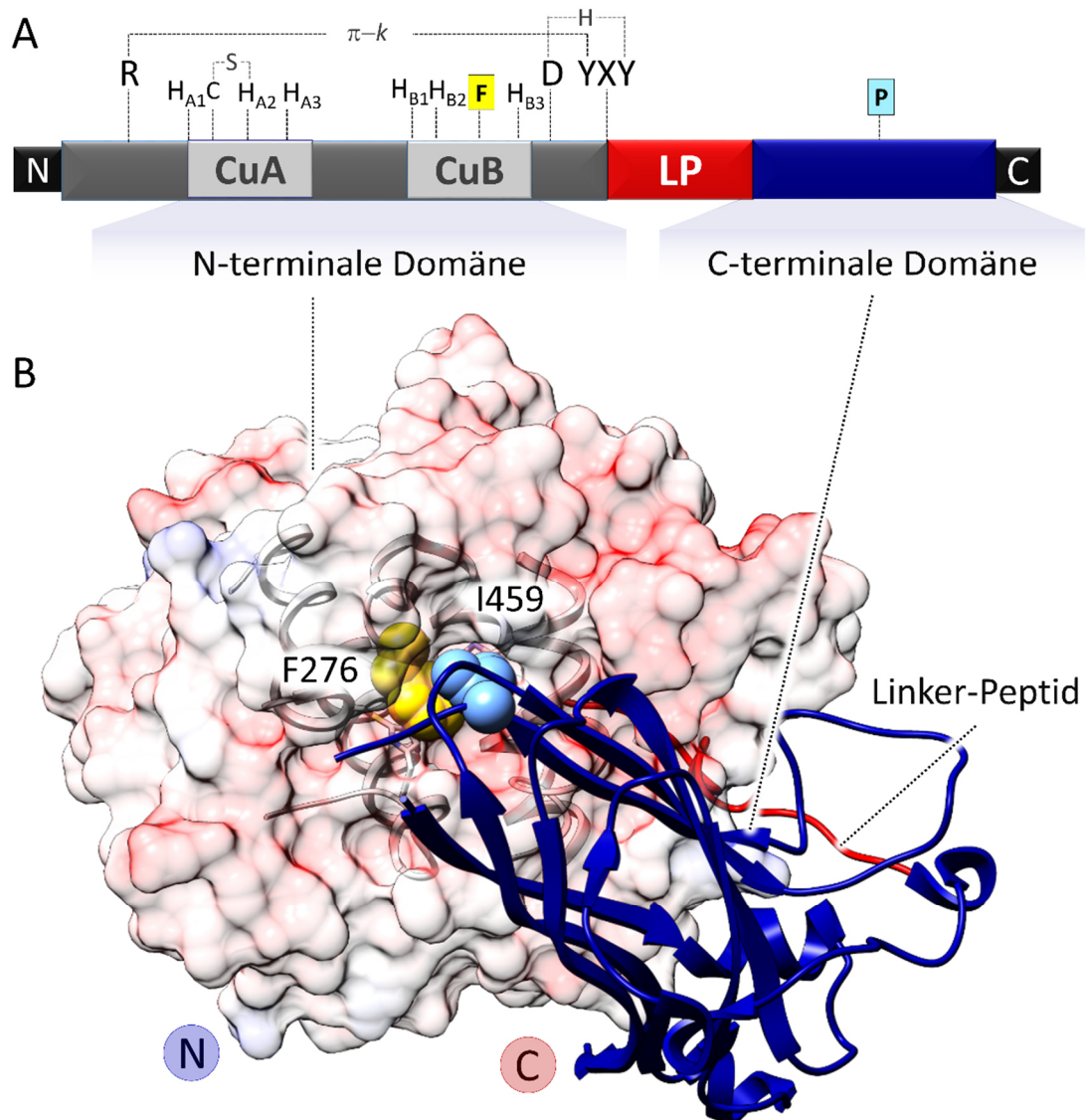


Abb. 4: Schematische Darstellung der Domänen-Struktur latenter pflanzlicher PPOs. (A) Schematischer Aufbau der Primärstruktur einer latenten PPO nach der Translokation in das Thylakoidlumen (ohne Transit-Peptid). Die N-terminale Domäne (Tyrosinase-Domäne, grau) beherbergt das katalytische Dikupfer-Zentrum. Hier werden die beiden Kupfer-Ionen des CuA- und CuB-Motivs (dunkelgrau) von jeweils drei Histidinen (H_{A1} , H_{A2} , H_{A3} bzw. H_{B1} , H_{B2} , H_{B3}) koordiniert. Die Tyrosinase-Domäne endet definitionsgemäß nach Marusek et al., (2006) auf das hoch konservierte Tyrosin-Motiv (YxY). Dieses wiederum erhält die strukturelle Integrität der Tertiärstruktur durch eine stabilisierende π -kationische Wechselwirkung (π -k) eines der beiden Tyrosine mit einem räumlich benachbarten Arginin (R) (Marusek et al., 2006). Das zweite stromabwärts gelegene Tyrosin bildet seinerseits wiederum eine stabilisierende Wasserstoffbrücke (H) mit einem strikt konservierten Aspartat (D). Ein weiteres konserviertes Strukturelement bei pflanzlichen PPOs ist ein Cystein in unmittelbarer Nachbarschaft zu H_{A1} . Dieses bildet eine stabilisierende Thioetherbrücke (S) zu dem Imidazolring von H_{B2} aus. Dieses ist auf einer flexiblen Schleife lokalisiert und wird hierdurch wahrscheinlich stabilisiert (Klabunde et al., 1998). Im Bereich des CuB-Motivs befindet sich ein Phenylalanin (F, gelb), welches in den Tertiärstrukturen pflanzlicher PPOs am Zugang zum aktiven Zentrum lokalisiert ist, wodurch dieses partiell abgeschirmt wird. Einigen Hypothesen zufolge könnte das auch als Gate-Residue bekannte Phenylalanin den Zugang für bestimmte Substrate blockieren (Gerdemann et al., 2002b).

An die C-terminale Domäne schließt sich ein Linker-Peptid (LP, rot) an, welches die katalytische Domäne mit der regulativen C-terminalen Domäne (blau) verbindet. Das Linker-Peptid ist in vielen pflanzlichen PPOs Lysin- und Arginin-reich. Aufgrund der exponierten Lage in der Tertiärstruktur, könnte hier eine mögliche Interaktionsstelle für spezifischen anionischen Aktivatoren und Proteasen sein (Marusek et al., 2006; Leufken et al., 2015; Molitor et al., 2016). Die C-terminale Domäne verdeckt im latenten Zustand das katalytische Zentrum der N-terminalen Domäne und muss bei Aktivierung der Enzyme

entfernt werden. Hierbei wird ein sogenannter Platzhalter-Rest (P, hellblau), der den Zugang durch Wechselwirkung mit dem *Gate-Residue* vermutlich verschließt, ebenfalls delokalisiert. (B) Tertiärstruktur der ersten vollständigen latenten PPO *CgAUS1* (PDB-ID: 4Z12) aus *C. grandiflora*. Hier verdeckt die C-terminale Domäne (blau) das aktive Zentrum. Wie zu erkennen ist, tritt der Platzhalter (I456) in hydrophobe Wechselwirkung mit dem *Gate-Residue* (F273, gelb). Zudem ist das vergleichsweise kurze Linker-Peptid (rot) zu erkennen.

et al., 2006; Koussevitzky et al., 2008). Beginnend mit einer katalytischen N-terminalen Domäne (Tyrosinase-Domäne), welche das Dikupfer-Zentrum trägt, schließt sich ein oberflächenexponiertes Linker-Peptid (LP) und eine regulative C-terminale Domäne an (Abb.4, B). Anhand der Kristallstruktur der homologen Aureusidin Synthase konnte gezeigt werden, dass dieses Linker-Peptid als flexible Schleife mit einer Länge von ca. 10-18 Aminosäuren relativ kurz ist (Molitor et al., 2016). Die Sekundärstrukturvorhersagen, die auf Grundlage verschiedener Primärstrukturen von pflanzlichen PPOs erstellt und mit den Strukturdaten aus der Kristallstruktur eines Hämocyanins von *O. dofleini* (*OdHC*, PDB-ID: 1JS8) verglichen wurden, prognostizierten z.B. für die PPO aus *V. vinifera* eine Länge des Linker-Peptids von 71 Aminosäuren (Marusek et al., 2006). Hierbei wurde der Sequenzabschnitt definiert, welcher den Teilbereich vom Ende des konservierten Tyrosin-Motivs (YxY) bis zum Anfang der ersten vorhergesagten β -Faltblattstruktur der C-terminalen Domäne umspannt. Dieses Kriterium wurde gewählt, da pflanzliche PPOs in diesem Bereich im Vergleich zu *OdHC* relativ lange Insertionen tragen (Marusek et al., 2006).

An Sekundärstrukturelementen innerhalb der katalytischen N-terminalen Domänen finden sich hauptsächlich α -Helices, während in den C-terminalen Domänen unterschiedlichster Typ 3-Kupferproteine β -Faltblattstrukturen dominieren. Letztgenannte arrangieren sich dort zu typischen β -Fass-Strukturen (Cuff et al., 1998; Klabunde et al., 1998; Virador et al., 2010; Fujieda et al., 2013; Mauracher et al., 2014; Bijelic et al., 2015; Molitor et al., 2016).

Es ist schon seit geraumer Zeit bekannt, dass sich latente PPOs *in vitro* durch Zugabe von SDS (Natriumdodecylsulfat) in die enzymatisch aktiven Formen konvertieren lassen (Jiménez und García-Carmona, 1996; Gandía-Herrero et al., 2005; Kanade et al., 2006). Eine mögliche Interaktionsstelle des SDS könnte hierbei der Lysin- und Arginin-reiche Linker-Bereich sein (Marusek et al., 2006; Leufken et al., 2015). (Marusek et al., 2006; Leufken et al., 2015).

Die C-terminale Domäne übernimmt *in vivo* höchstwahrscheinlich eine regulative Funktion und hält die Vorläuferproteine in einem latenten Zustand (Marusek et al., 2006; Decker et al., 2007). Wie anhand der Kristallstruktur von *CgAUS1* demonstriert werden konnte, verdeckt die C-terminale Domäne den Zugang zum aktiven Zentrum (Molitor et al., 2016). Hierbei weist ein Isoleucin (Ile456) in Richtung der katalytischen Tasche, wodurch diese sterisch blockiert wird. Ähnliches wurde auch für *OdHC* sowie für die C-terminale Domäne von *IbCO-1* gezeigt (Cuff et al. 1998; Gerdemann et al., 2002a; Decker et al., 2007). Letztere konnte über ein Homologiemodell auf Basis des *OdHCs* erstellt werden (Decker et al., 2007). Dieser spezifische Aminosäurerest ist auch als Platzhalter bekannt und ist ebenfalls für viele anderen Typ 3-Kupferproteine konserviert (Decker und Rimke 1998; Decker und

Tuczek, 2000; Jaenicke und Decker, 2004, Matoba et al., 2006; Marusek et al., 2006; Fujieda et al., 2013; Mauracher et al., 2014). Es wird diskutiert, dass dieses bei Aktivierung der jeweiligen Enzyme entfernt wird und hierdurch der Zugang zum Dikupfer-Zentrum für Substrate freigelegt wird (Decker und Rimke, 1998; Matoba et al., 2006; Marusek et al., 2006; Decker et al., 2007, Rolff et al., 2011). Dies kann durch proteolytische Spaltung höchstwahrscheinlich im Bereich des Linker-Peptids oder durch induzierte Konformationsänderungen erfolgen, die durch SDS, Phospholipide, Fettsäuren oder auch Säure-induziert vermittelt werden können (Kenten, 1957; Goldbeck und Cammarata, 1981; Tolbert, 1973; Gandía-Herrero et al., 2005; Flurkey und Inlow 2008; Cong et al., 2009; Saeidian et al., 2007 Naresh et al., 2015). Zudem tritt der Platzhalter im latenten Zustand der PPOs in Interaktion mit einem bestimmten Phenylalanin, welches auch als *Gate-Residue* bezeichnet wird (Klabunde et al., 1998; Eicken et al., 1999; Marusek et al., 2006). In der *lbCO-1* Struktur befindet sich dieses auf einer flexiblen Schleife am Zugang zum aktiven Zentrum, wodurch dieses partiell abgeschirmt wird (Klabunde et al., 1998). Es wurde diskutiert, dass dieses Phenylalanin, welches für pflanzliche PPOs hoch konserviert ist, den Zutritt für bestimmte Substrate zum Dikupfer-Zentrum kontrollieren könnte (Eicken et al., 1999; Marusek et al., 2006; Decker et al., 2007).

In pflanzlichen PPOs wird die strukturelle Integrität des nativen Faltungszustands der katalytischen N-terminalen Domäne durch bestimmte konservierte Aminosäurereste erhalten. (Marusek et al., 2006). So finden sich bei den meisten bekannten PPOs zwei konservierte intermolekulare Disulfidbrücken, eine stabilisierende Kation- π -Wechselwirkung zwischen einem konservierten Arginin und einem Tyrosin sowie einer stabilisierenden Wasserstoffbrücke zwischen einem strikt konservierten Aspartat und einem weiteren Tyrosin. Beide genannten Tyrosine sind Teil des hoch konservierten Tyrosin-Motivs (YxY), welches das C-terminale Ende der N-terminalen Domäne kennzeichnet (Marusek et al., 2006). Des Weiteren finden sich bei pflanzlichen PPOs ungewöhnliche Thioether (Klabunde et al., 1998, Virador et al., 2010; Bijelic et al., 2015, Molitor et al., 2016). Diese werden zwischen dem Imidazolring von H_{A2} und einem räumlich benachbarten Cystein gebildet und stabilisieren vermutlich das CuA-Motiv (Klabunde et al., 1998).

2.2 Die Kristallstruktur der N-terminalen Domäne von VvPPOg aus *V. vinifera*

Wie bereits in 2.1 erwähnt, ist die Tertiärstruktur der N-terminalen prozessierten PPO aus *V. vinifera* L. cv. Grenache bereits kristallographisch gelöst worden (PDB-ID: 2P3X, Virador et al., 2010). Hier konnte das ca. 38 kDa schwere Protein der katalytischen Domäne aus Trauben biochemisch isoliert und chromatographisch gereinigt werden. Zudem wurde die Primärstruktur des PPO-Gens mittels cDNA Klonierung und Sequenzierung erhalten. Die gelöste Röntgenkristallstruktur erzielte eine maximale Auflösung von 2,2 Å. Der Dikupfer-Komplex befindet sich im *met*-Zustand mit einem verbrückten

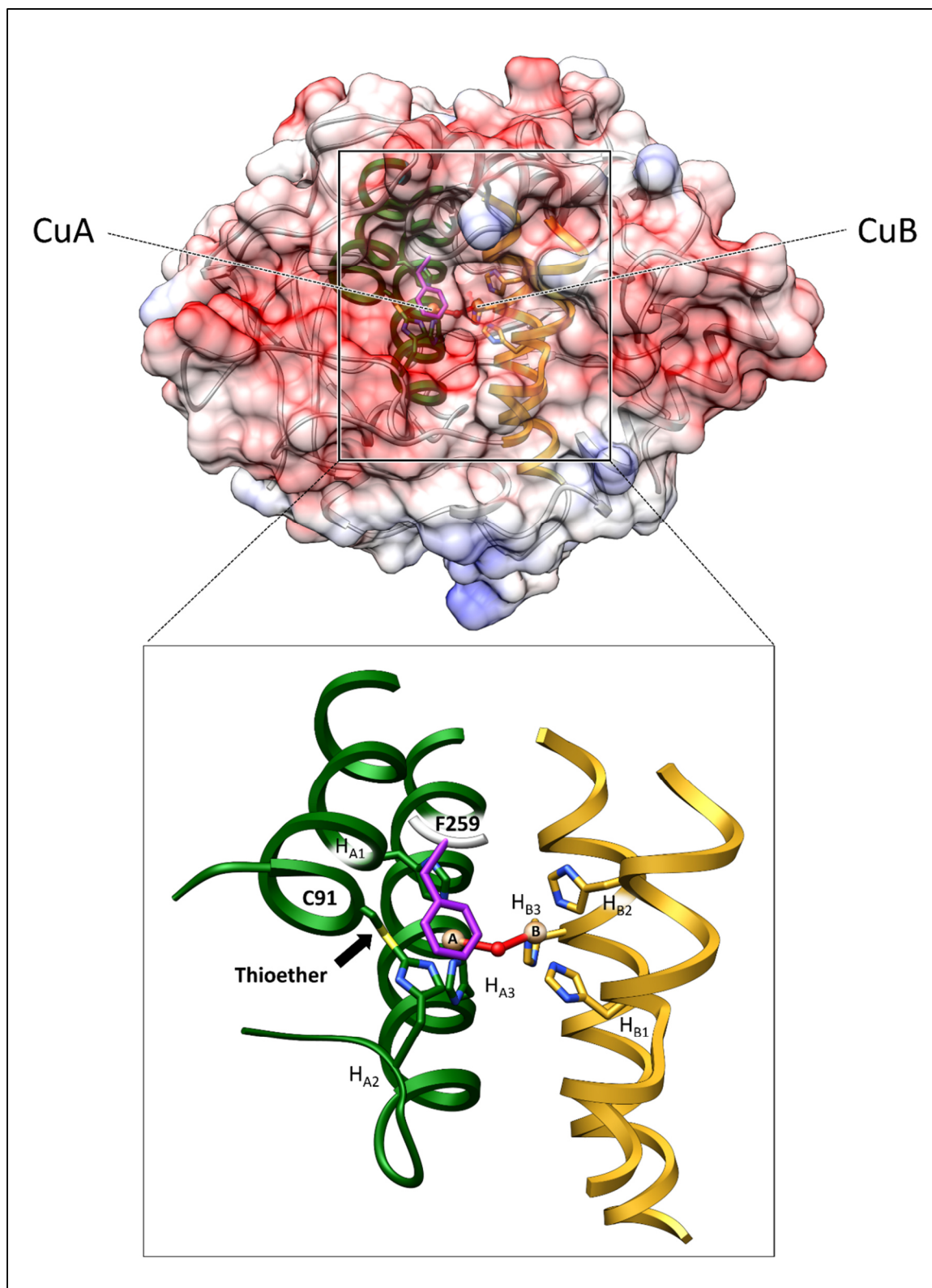


Abb. 5: Tertiärstruktur der prozessierten katalytischen N-terminalen Domäne von VvPPOg aus *V. vinifera* L. cv. Grenache. Darstellung der prozessierten N-terminalen Domäne (PDB-ID: 2P3X) im Bändermodell mit der überlagerten Oberflächendarstellung. Das konservierte „4- α -Helix-Bündel-Motiv“ ist in den beiden Teilabbildungen jeweils farblich hervorgehoben (CuA-Motiv, grün; CuB-Motiv, gelb). Die Struktur liegt im met-Zustand vor, in welchem ein Hydroxidion (rot) CuA und CuB verbrückt. Wie zu erkennen ist schirmt das Gate-Residue (F259, violett) die CuA-Seite ab. Zusätzlich ist in der unteren Detailansicht des Vier-Helix-Bündel-Motivs zu erkennen, dass H_{A2} eine Position auf einer flexiblen Schleife einnimmt, während die übrigen Histidine von starren Helices bereitgestellt werden. Vermutlich wird H_{A2} durch diese Thioetherbrücke zu C91 stabilisiert (Pfeil).

Hydroxidion. Die Tertiärstruktur dieses Proteins setzt sich aus 13 α -Helices sowie 5 oft sehr kurzen β -Faltblattstrukturen zusammen und besitzt am C-terminalen Ende einen geringen Anteil (9 Aminosäuren) des Linker-Peptids. Zudem befindet sich in der Struktur eine Thioetherbrücke zwischen C91 und H108 (H_{A2}) auf topologisch identischer Position, wie in *IbCO-1* aus *I. batatas* (PDB-ID: 1BT3, Klabunde et al., 1998).

3. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein rekombinantes Expressionssystem in *E. coli* für PPO-Isoformen aus *V. vinifera* zu etablieren. Die rekombinanten Proteine sollten hierfür möglichst hohe Sequenzidentitäten zur Referenzstruktur von VvPPOg aufweisen (Virador et al., 2010).

Hierzu sollte aus dem Cultivar Cabernet Sauvignon Gesamt-RNA extrahiert, in cDNA umgeschrieben und diese als Basis für die Generierung der benötigten Expressionskonstrukte genutzt werden. Zudem war es erforderlich, die rekombinanten Proteine in nativer Form in hoher Reinheit zu gewinnen. Daher war es vorgesehen die rekombinanten Proteine als Fusionsproteine mit spezifischen Affinitäts-Tags (Polyhistidin, StrepII) zu exprimieren, um die spätere biochemische Aufreinigung mit Hilfe von Affinitätschromatographie zu ermöglichen. Um die spezifischen katalytischen Aktivitäten der rekombinanten Proteine untersuchen zu können, sollte zudem die entsprechenden Gene mittels PCR-basierter, ortsgerichteter Mutagenese modifiziert werden. Hierbei sollten bestimmte Aminosäuren substituiert bzw. deletiert werden, welche zur Diskussion stehen, die katalytische Aktivität von Typ 3-Kupferproteinen signifikant zu beeinflussen. Die erzeugten Muteine sollten anschließend auf ihre enzymatische Funktionalität mit Hilfe eines biochemischen Assays überprüft werden.

B Material und Methoden

1. Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien (p.a. Qualität) und Reagenzien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Applichem (Darmstadt), Fermentas (Thermo Fisher Scientific, Schwerte), Invitrogen™ (Life Technologies, Darmstadt), Macherey-Nagel (Düren), New England Biolabs (Frankfurt), Novagen® (Merck Millipore, Darmstadt), Peqlab (Erlangen), Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roche (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Hamburg), Thermo Scientific (Schwerte).

Die Reaktionsgefäße in den Volumengrößen 1,5 ml bzw. 2 ml wurden von den Firmen Brand (Wertheim) und Roth (Karlsruhe), die 0,2 ml bzw. 0,5 ml Gefäße von der Firma Thermo Scientific (Schwerte) und Roth (Karlsruhe) erworben. Polypropylenröhrchen mit Schraubdeckel in den Volumeneinheiten 15 ml und 50 ml sowie Petrischalen und Pipettenspitzen stammen von den Firmen Greiner Bio One (Frickenhausen) und Roth (Karlsruhe).

2. Geräte und Hilfsmittel

Nachfolgend finden sich die verwendeten Geräte und Materialien tabellarisch gelistet.

2.1 Geräte

Tab. 1: Verwendete Geräte

Geräte	Typ	Firma
Analytische Waage	Excellence	Sartorius (Göttingen)
Autoclaven	3850 EL	Tuttnauer (Gießen)
	DX-23	Systec (Wettenberg)
	VX-75	Systec (Wettenberg)
Binokkular	SZ-CTV	Olympus (Hamburg)
Digitalkamera	PowerShot A95	Canon (Tokio, Japan)
Demineralisationsanlage	Milli-Q Advantage A 10	Millipore (Darmstadt)
Eismaschine	ZBE 30-10	Ziegra-Eismaschinen (Isernhagen)
Heizgeräte	Heizblock, HB2	Wealtetec (Cambridge, UK)
Inkubationsgeräte	Brutschrank	Memmert (Schwabach)
	Schüttelinkubator, WiseCube	Witeg Labortechnik (Wertheim)
	Schüttelinkubator, Centromat	Braun Biotech (Melsungen)

Geräte	Typ	Firma
Sonikator	SONOPLUS HD2200	Bandelin (Berlin)
Spektrophotometer	Cary 300	Varian (Darmstadt)
	NanoDrop™, ND-1000	Peqlab (Erlangen)
	NanoDrop™, ND-2000c	Peqlab (Erlangen)
Plattenlesespektrometer	Infinite® M1000 PRO	Tecan (Crailsheim)
	Varioskan™ Flash	Thermo Scientific (Dreieich)
CD-Spektrometer	J-815	Jasco (Groß-Umstadt)
Geldokumentation (Agarose)	UV-Transilluminator	Peqlab (Erlangen)
	Geldokumentationssystem S/W Video-Thermodrucker P93	Peqlab (Erlangen)
	ChemiDoc™ MP System 170- 8280	Mitsubishi Electric (Ratingen)
Geldokumentation (PAGE)		BIO-RAD (München)
Magnetrührer	RCT basic	Ika Labortechnik (Staufen)
Netzgerät	Power Pac 300	BIO-RAD (München)
Elektrophorese	Agarosegel, horizontal, PerfectBlue Mini M, Mini S	Peqlab (Erlangen)
	PAGE, Novex Mini-Cell,	Life Technologies (Darmstadt)
	Mighty Small SE200 series	Hoefer (Holliston, MA, USA)
pH-Meter	SevenCompact™	Mettler Toledo (Gießen)
	766 Calimatic	Knick (Berlin)
PCR-Werkbank	PCR-Workstation Pro	Peqlab (Erlangen)
Thermocycler	PeqSTAR 2 x Gradient	Peqlab (Erlangen)
Vortexgerät	Reax 2000	Heidolph (Schwabach)
Wasserbad	Julabo U3	Julabo (Seelbach)
Zentrifugen	Tischzentrifuge, Avanti J30 I	Beckman (München)
	Tischzentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)
	Tischzentrifuge, 5415 R	Eppendorf (Hamburg)
	Tischzentrifuge, Universal 32 R	Hettich (Tuttlingen)
	Minizentrifuge, Spectrafuge	neoLab (Heidelberg)
	Standzentrifuge, Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments (Wilmington, USA)
	Ultrazentrifuge, Optima L-70K	Beckman (München)

2.2 Chemisch kompetente Bakterienstämme

Tab. 2: Verwendete chemisch kompetente *E. coli*-Stämme

Organismus	Stamm	Firma
<i>E. coli</i>	One Shot® TOP10	Invitrogen, Life Technologies
<i>E. coli</i>	Novablue Singles™	Novagen®, Merck Millipore
<i>E. coli</i>	Stellar™ Chemically Competent Cells	Clontech-Takara Bio Europe
<i>E. coli</i>	BL21 Competent Cells	Invitrogen, Life Technologies
<i>E. coli</i>	Rosetta™ 2 (DE3) pLysS	Novagen®, Merck Millipore

2.3 Plasmidvektoren

Tab 3: Verwendete Plasmidvektoren

Plasmidbezeichnung	Firma
pCR™II-TOPO® vector	Invitrogen™, Life Technologies
pGEM®-T vector	Promega
pTrcHis- TOPO® TA	Invitrogen™, Life Technologies
pTrcHis2-TOPO® TA	Invitrogen™, Life Technologies
pET 51b(+)	Novagen®™, Merck Millipore

2.4 Nährmedien und Agarplatten

Tab 4: Verwendete Kulturmedien

Medium	Zusammensetzung	Firma
LB (Lennox)	Trypton [10 g/l]	Roth
	Hefeextrakt [5 g/l]	
	Natriumchlorid (NaCl) [5 g/l]	
LB-Agar	Trypton [10 g/l]	Roth
	Hefeextrakt [5 g/l]	
	Natriumchlorid (NaCl) [10 g/l]	
	Agar-Agar [15 g/l]	

ZYM-5052	Trypton [10 g/l]	Roth
	Hefeextrakt [5 g/l]	
	Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl) [50 mM]	
	Natriumsulfat (Na ₂ SO ₄) [50 mM]	
	Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) [25 mM]	
	Dinatriumhydrogenphosphat (K ₂ HPO ₄) [25 mM]	
	Glycerin [0,5 % (w/v)]	
	Glucose [0,05 % (w/v)]	
	α-D-Lactose [0,2 % (w/v)]	
Magnesiumsulfat (MgSO ₄) [2 mM]		
Spurenelemente	FeCl ₃ [50 μM]	Roth
	CaCl ₂ [20 μM]	
	MnCl ₂ [10 μM]	
	ZnSO ₄ [10 μM]	
	COCl ₂ [10 μM]	
	CuCl ₂ [25 - 350 μM]	
	NiCl ₂ [2 μM]	
	Na ₂ MoO ₄ [2 μM]	
	Na ₂ SeO ₃ [2 μM]	
H ₃ BO ₃ [2 μM]		
SOC	Trypton [20 g/l]	Novagen®, Merck Millipore
	Hefeextrakt [5 g/l]	
	Natriumchlorid (NaCl) [0,5 g/l]	
	Kaliumchlorid (KCl) [0,186 g/l]	
	Magnesiumsulfat (MgSO ₄) [5 g/l]	
α-D-Glucose [3,6 g/l]		
<i>Overnight Express™ Instant LB</i>		Novagen®, Merck Millipore

2.5 Antibiotika

Tab. 5: Verwendete Antibiotika

Bezeichnung	Firma
Ampicillin [50-100 µg/ml]	Roth
Carbenicillin [50-100 µg/ml]	Roth
Chloramphenicol [32µg/ml]	Roth

2.6 Verwendete Enzyme

Tab. 6: Verwendete Enzyme

Enzym	Firma
Benzonase®	Novagen®, Merck Millipore
Lysozym	Novagen®, Merck Millipore
DpnI	New England Biolabs
NotI-HF	New England Biolabs
BamH1-HF	New England Biolabs
DreamTaq DNA Polymerase	Thermo Fisher Scientific
Expand High Fidelity PCR System	Roche
KOD Hot Start DNA Polymerase	Novagen®, Merck Millipore
SuperScript® III Reverse Transcriptase	Invitrogen™, Life Technologies
T4-DNA-Ligase	Promega
<i>Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal</i> (CIP)	New England Biolabs
<i>Agaricus bisporus</i> Tyrosinase (AbTY)	Sigma, Aldrich

2.7 Reagenzienkits

Tab 7: Verwendete Reagenzienkits

Kit	Firma
<i>High Pure Plasmid Isolation Kit</i>	Roche
<i>NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up</i>	Macherey-Nagel
<i>NucleoSpin® RNA Plant</i>	Macherey-Nagel
<i>TRIzol® Plus RNA Purification Kit</i>	Invitrogen™, Life Technologies
<i>Expand™ High Fidelity PCR System</i>	Roche
<i>In-Fusion® HD Cloning Kit</i>	Clontech Takara Europe

2.8 DNA- und Protein-Marker

Tab. 8: Verwendete Marker

Marker	Firma
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, Thermo Fischer Scientific
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	BIO-RAD
Precision Plus Protein™ Unstained Standards	BIO-RAD
peqGold™ Protein-Marker IV	Peqlab, Erlangen

3. Allgemeine Vorsichtsmaßnahmen

Für das molekular- und mikrobiologische Arbeiten wurden sämtliche Laborgeräte, Lösungen, sowie Glas- und Verbrauchsmaterialien vor der Verwendung bei einer Temperatur von 121 °C und ca. 2-3,2 bar Überdruck für 10 - 45 Minuten autoklaviert. Des Weiteren kamen steril filtrierte Lösungen für das mikrobiologische Arbeiten zum Einsatz. Puffer, Lösungen und Medien wurden je nach Bedarf entweder mit Reinstwasser (Milli-Q-H₂O), DEPC-H₂O (Diethylpyrocarbonat, 0,1 %) oder VE-H₂O angesetzt. Zum Schutz vor potentiellen Kontaminationen wurde bei jedem Arbeitsschritt Latex-Einmalhandschuhe und beim Umgang mit ätzenden, reizenden und toxischen Substanzen stets Nitril-Handschuhe verwendet. Sämtliche RNA-Lösungen wurden mit DEPC-H₂O hergestellt und die Experimente mit sterilen, gestopften Pipettenspitzen sowie RNase freien Geräten, Glas- und Verbrauchsmaterialien durchgeführt. Die Präparation und Extraktion von RNA aus pflanzlichen Geweben sowie das Ansetzen von DNA-haltigen Lösungen, erfolgte unter sterilen Bedingungen an einer PCR – Workstation Pro (Peqlab, Erlangen). Thermolabile und andere sensible Protein-, Enzym- und Nukleinsäure-Lösungen wurden während des Gebrauchs stets auf Eis gehalten und transportiert.

4. Mikrobiologische Methoden

4.1 Nährmedien

Die Rezepturen der verwendeten Nährmedien und Lösungen sind Tabelle 2.3 zu entnehmen. Alle Medien wurden mit Reinstwasser angesetzt und 10-30 Minuten bei 121 °C und 2-3,2 bar autoklaviert. Um ein selektives Wachstum der Bakterien zu ermöglichen, wurden den Medien nach Abkühlung auf ca. 55°C, die für die Plasmid-kodierten Resistenzen entsprechenden Antibiotika, in den angegebenen Konzentrationen (siehe 2.4, Tab. 5) zugesetzt. Medien, die für Blau-Weiß-Selektion bestimmt waren, wurden zusätzlich mit 0,5 mM IPTG (Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranosid) und 80 µg/ml X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indoyl-β-D-Galactopyranosid) angereichert. Für die Selektion und Anzucht von

Expressionsbakterien wurden Agarplatten und Medien zusätzlich mit 1 % Glucose versehen, um potentiell auftretende Basalexpressionen minimal zu halten.

Nach Zugabe der entsprechenden thermolabilen Additive, wurde der warme Nähragar rasch in sterile Petrischalen (\varnothing 8,5 cm) überführt und nach Aushärten für längere Zeit bei 4°C gelagert.

4.2 Plattenkulturen

Transformanten und Bakterien aus Glycerinkulturen wurden unter sterilen Bedingungen an einer PCR-Workstation Pro (PqLab, Erlangen) auf den speziellen Selektionsagarplatten ausgestrichen. Zu diesem Zweck wurden Glas - Pasteurpipetten über einer Bunsenbrennerflamme zuvor sterilisiert und thermisch in geeignete Form gebracht. Mit Hilfe dieser konnten die Bakteriensuspensionen anschließend dünn ausgestrichen werden. Danach wurden die Plattenkulturen bei 37°C für 14-16 Stunden inkubiert.

4.3 Flüssig- und Vorkulturen

Für die Herstellung von Flüssigkulturen wurden die Bakterienkolonien mittels steriler, gestopfter Pipettenspitzen aufgenommen und in 3-5 ml LB-Medium überführt. Dieses wurde kurz vor der Verwendung mit den entsprechenden Antibiotika, welche kompatibel zu den jeweiligen Vektor-spezifischen Resistenzgenen waren, versetzt. Die Kulturen wurden in 15 ml Polypropylenröhrchen unter mäßiger Belüftung für 14-16 Stunden (Über-Nacht-Kultur) bei 37°C und 200 rpm in einem WiseCube Schüttelinkubator (Witeg Labortechnik, Wertheim) kultiviert.

4.4 Produktionskulturen

Für die Gewinnung der rekombinanten PPOs aus *V. vinifera*, wurden Produktionskulturen in 1 l Ansätzen verwendet. Die Kultivierung erfolgte entweder unter Verwendung eines LB-Mediums und Induktion der Proteinexpression mittels manueller Zugabe von IPTG (Isopropyl-(β -D-thiogalactopyranosid) oder wurden mit Hilfe von Autoinduktion in ZYM-5052 Medium nach Studier et al. (2005) bzw. *Overnight Express™ Instant LB Medium* (Novagen®, Merck, Darmstadt) durchgeführt. Dazu wurden die jeweiligen Medien kurz vor der Verwendung mit den geeigneten Antibiotika versetzt und anschließend mit 500 μ l einer Über-Nacht-Kultur (siehe 2.3, Tab. 4) beimpft. Die Kultivierung der Expressionskulturen erfolgte in 2 l Erlenmeyer-Schikane-Kolben. Je nach Expressionsprotokoll wurde die Kultivierung bei 24-37°C für 7 - 48 Stunden und 150- 200 rpm in einem WiseCupe Schüttelinkubator (Witeg Labortechnik, Wertheim) durchgeführt.

4.5 Glycerinkulturen

Um sowohl selektierte und sequenzierte Plasmidvektoren, als auch Expressionskonstrukte als entsprechende Transformanten über einen längeren Zeitraum konservieren zu können, wurden Glycerinkulturen angelegt. Dazu wurden Roti®-Store Cryoröhrchen der Firma Roth (Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers verwendet.

5. Molekularbiologische Methoden

5.1 Gewebematerial für die RNA-Gewinnung

Gewebematerial, welches für die RNA-Extraktion genutzt werden sollte, wurde über das Weingut Fleischer in Mainz bezogen. Bei der Probennahme wurden junge, aktiv wachsende Blätter und Knospen von *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon mittels Skalpell von den Reben entfernt und vor Ort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Langfristig wurden die Gewebeproben bei – 80°C gelagert.

5.2 RNA-Extraktion

Für die Extraktion von Gesamt-RNA aus Blattgewebe kamen mehrere Methoden zum Einsatz. Unter anderem wurde das *TRIzol*®-Reagenzes (Invitrogen™, Life Technologies, Darmstadt) genutzt. Aufgrund unvollständiger Phasenseparation, was vermutlich auf den hohen Anteil von Polyphenolen im Lysat zurückzuführen war, erwies sich dieses jedoch als nicht praktikabel.

Als geeignete Methode konnte ein Protokoll nach Iandolo et al. (2004) für die Gewinnung von Gesamt-RNA aus *V. vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon adaptiert werden. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass störende Polyphenole mittels PVP (Polyvinylpyrrolidon) gefällt werden. Zudem ermöglicht das eingesetzte CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid) ein effektives Abtrennen von Polysacchariden, Proteinen und Zelltrümmern. Die eingesetzten Reagenzien sind Tabelle 9 zu entnehmen. Die Durchführung erfolgte nach oben genanntem Protokoll. Hierbei wurde lediglich auf die Zugabe von Spermidin verzichtet. Die abschließend nach Zentrifugation erhaltenen Nukleinsäure-Pellets wurden in DEPC-H₂O resolubilisiert und mittels *NucleoSpin*® *RNA Plant Kit* (Macherey-Nagel, Düren) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt. Die eluierte RNA wurde kurzfristig bei – 80°C gelagert oder direkt im Anschluss für RT-Reaktionen genutzt.

Tab. 9: Zusammensetzung des Lyse – und Extraktionspuffers

Lösungen	Bestandteile
Lyse- und Extraktionspuffer	100 mM Tris-HCl, pH 8 25 mM EDTA 2 % CTAB (Hexadecyltrimethylammoniumbromid) 2,5 M NaCl 2 % PVP Lösung (w/v) β-Mercaptoethanol Cholrophorm Isoamylalkohol (24:1)

5.3 RT-PCR

Ausgehend von zuvor isolierter Gesamt-RNA sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit spezifische PPO-Gene aus *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon mittels PCR amplifiziert, kloniert und anschließend sequenziert werden. Um eine geeignete Matrize für die verwendeten DNA-Polymerasen zu schaffen, war es daher erforderlich, die extrahierte RNA in cDNA umzuschreiben. Dies wurde mit Hilfe einer SuperScript™ III Reversen Transkriptase (Invitrogen™, Life Technologies, Darmstadt) realisiert. Die Versuchsdurchführung erfolgte hierbei nach Herstellerangaben. In den einzelnen Reaktionen wurden RNA-Mengen von ca. 600-800 ng eingesetzt. Zu Beginn der jeweiligen RT-Reaktionen wurde ein initialer Denaturierungsschritt von 5 – 10 min bei 65°C durchgeführt. Hierdurch wird eine Auffaltung von Sekundärstrukturen bewirkt, wodurch die Reverse Transkriptase an Effektivität gewinnt und im Idealfall vollständige cDNA-Transkripte generiert werden. Für die jeweiligen RT-Reaktionen wurde auf Oligo-(dT)-Primer zurückgegriffen. Die anschließenden *Touchdown*-PCR-Reaktionen (siehe 5.7.1), bei welchen die erhaltene cDNA als Matrize diente, erfolgte mit Hilfe des *Expand™ High Fidelity PCR Systems* der Firma Roche (Mannheim). Hierfür wurden genspezifische Primer eingesetzt (siehe Anhang G 2.). Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert und die gewünschten Banden mit Hilfe eines sterilen Skalpell aus geschnitten. Für die Aufreinigung der PCR-Produkte aus den Agarosestücken wurde das *Nucleospin® PCR Clean-up Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Angaben des Herstellers genutzt. Danach wurden die erhaltenen DNA-Fragmente in einen pCR™II-TOPO® Vektor des *TOPO® TA Cloning® Dual Promoter Kits* der Firma Invitrogen™ (Life Technologies, Darmstadt) ligiert und mittels Hitzeschock in chemisch kompetente One Shot® TOP10 (Invitrogen™, Life Technologies, Darmstadt) Zellen eingebracht. Nach Plasmidisolierung wurden die Proben durch die Firma StarSEQ (Mainz) sequenziert.

5.4 Quantifizierung von Nukleinsäuren mittels UV/Vis-Spektroskopie

Aufgrund der spezifischen Eigenschaft von Nukleinsäuren Licht bestimmter Wellenlängen zu absorbieren, ist es möglich, ihre Konzentration in Lösungen photometrisch zu bestimmen. Hierbei weisen die aromatischen Nukleobasen ein Absorptionsmaximum von 260 nm auf.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Quantifizierungen der verwendeten Nukleinsäurelösungen wurden mittels NonoDrop™ (ND 1000 und ND 2000c) bei einer Wellenlänge von 260 nm und einer optischen Weglänge von 1 mm durchgeführt. Die Messungen erfolgten jeweils in Doppelbestimmung. Für die Abschätzung der spezifischen Konzentrationen wurden folgende Richtwerte für einen definierten Strahlengang von 10 mm berücksichtigt.

OD₂₆₀ = 1 entspricht: 50 µg/ml dsDNA
 40 µg/ml ssDNA
 33 µg/ml ssRNA

Die Überprüfung der Probenreinheit erfolgte anhand des Verhältnisses der gemessenen OD-Werte bei 230 nm, 260 nm und 280 nm. Charakteristisch für reine DNA ist hierbei ein Absorptionsquotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ von 1,8, während dieser für reine RNA bei ca. 2,0 liegt. Ermittelte Absorptionsmaxima bei 230 nm weisen auf verschleppte chaotrope Salze bzw. auf Kontaminationen durch Polysaccharide und Phenole hin. Erhöhte Absorptionen bei 280 nm werden zumeist durch Proteinverunreinigungen hervorgerufen.

5.5 Primer-Design

Die verwendeten Primer (Oligonukleotide), welche für die gezielte Amplifikation bestimmter Genabschnitte von PPOs aus *V. vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon oder für die Einführung spezifischer Mutationen mit Hilfe PCR-vermittelter ortsgerichteter Mutagenese bestimmt waren, wurden in lyophilisiertem Zustand von den Firmen Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) und Invitrogen™ AG (Life Technologies, Darmstadt) bezogen. Die entsprechenden Stammlösungen betragen Konzentrationen von 100 µM und wurden mit DEPC-H₂O angesetzt. In den Zielexperimenten wurden die jeweiligen Primer, wenn im Text nicht anders angegeben, (ausgehend von 10 µM Stammlösungen) in Endkonzentrationen von 0,25 – 0,5 µM eingesetzt.

Bei dem Entwurf genspezifischer PCR-Primer wurden folgende Kriterien beachtet:

- Die verwendeten PCR-Primer sollten eine spezifische Länge von 18 – 30 Nukleotiden besitzen.
- Die Ausbildung von Sekundärstrukturen bzw. Primer-Dimeren sollte vermieden werden.
- Es wurde darauf geachtet, dass die verwendeten Primer ein ausgewogenes AT/GC-Verhältnis aufwiesen. Hierbei sollte der GC-Gehalt bei 40 – 60 % liegen.

- Im Idealfall sollte der 3'-Terminus eines Primers auf G oder C enden, was die Primer-Bindung an die Matrizen-DNA begünstigt.
- Die Schmelztemperatur der Primer (T_m) sollte zwischen 55 - 69°C liegen. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die verwendeten Primerpaare eine möglichst geringe Abweichung der Schmelztemperaturen aufwiesen.

5.5.1 Sequenzspezifische Primer

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Anfertigung genspezifischer Primersequenzen, die für die gezielte Amplifikation von PPO-Genabschnitten aus *V. vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon benötigt wurden unter Verwendung des Online Programms Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>). Als Referenz dienten aus der EST-Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) identifizierte PPO-Sequenzdaten aus *V. vinifera* sowie die Sequenz von VvPPOg (U83274). Anschließend wurden die erzeugten Primersequenzen mit dem Onlinedienst Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/Oligo-Analyzer/>) auf die oben genannten Eigenschaften überprüft.

5.5.2 Primer für die Herstellung der L-VvPPOcs-2- und L-VvPPOcs-3 Expressionskonstrukte

Um geeignete Amplifikate für die gerichtete Klonierung in den pET-51 b(+)-Vektor erzeugen zu können, war es erforderlich, spezifische Primer zu konstruieren, welche die benötigten Restriktionsschnittstellen (*Bam*HI) an den jeweiligen 5'-Termini besaßen (siehe Anhang G 2.). Mittels *Touchdown*-PCR unter Verwendung dieser Primer wurden die spezifischen Restriktionsschnittstellen an die 5'-Termini der entsprechenden Genabschnitte fusioniert. Um den gewünschten Leserahmen zu erhalten, musste zusätzlich ein weiteres Nukleotid an den 5'-Terminus des entsprechenden PPO-Gens fusioniert werden.

5.6 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (engl. polymerase chain reaction, PCR) ist eine molekularbiologische Methode zur gezielten *in vitro* Vermehrung eines definierten DNA-Abschnitts (Saiki et al., 1985; Mullis et al., 1986). Durch diese äußerst sensitive Methode ist es möglich, bestimmte DNA-Abschnitte innerhalb kürzester Zeit exponentiell zu amplifizieren. Dies wird durch die Aktivität spezieller thermostabiler DNA-Polymerasen erreicht. Ausgehend von einer einzelsträngigen DNA-Matrize wird durch die Polymerase-Aktivität eine Synthese des komplementären Tochterstrangs vorangetrieben. Voraussetzung hierfür ist die Supplementierung mit Desoxynucleosidtriphosphaten (dNTPs) und die Präsenz freier 3'-Hydroxygruppe, welche von den eingesetzten Oligonukleotiden (Primer) bereitgestellt werden. Diese 18 – 30 Nukleotide langen Primer binden an definierte komplementäre

Bereiche der einzelsträngigen DNA-Matrize (engl. *template*) und werden durch die DNA-Polymerase-Aktivität in 3'-Orientierung verlängert. Hieraus resultiert schließlich ein DNA-Doppelstrang.

Der Ablauf einer typischen PCR beginnt mit einem einmaligen initialen Denaturierungsschritt bei 92-98°C für ca. 3 Minuten. Thermisch induziert, zerfällt die doppelsträngige DNA-Matrize hierbei, durch Aufbrechen der Wasserstoffbrücken, in die beiden Einzelstränge. Für die Vervielfältigung des gewünschten DNA-Bereichs folgt nun ein zyklischer Ablauf von drei Temperaturstufen. Schritt 1 ist ein erneuter Denaturierungsschritt, der im Vergleich zum initialen Schritt mit ca. 20 – 45 Sekunden bei 92-98°C jedoch deutlich kürzer gewählt wird. Der darauf folgende Schritt 2 wird als *Annealing* bezeichnet, da sich die eingesetzten Primer an die komplementären Bereiche der DNA - Matrize anlagern. Die gewählte Temperaturstufe richtet sich dabei nach den spezifischen Schmelztemperaturen (T_m) der eingesetzten Primer und muss oftmals optimiert werden. Im Allgemeinen werden hierzu Temperaturen von 45 – 60°C für einen Zeitraum von ca. 30 Sekunden gewählt. Schritt 3 ist der sogenannte Elongations-Schritt. Hierbei vervollständigt die DNA-Polymerase den komplementären Tochterstrang durch Einfügen der eingesetzten dNTPs. Die Temperatur wird hierbei an das spezifische Temperaturoptimum der verwendeten DNA-Polymerase angepasst und liegt meist bei 72°C. Die Dauer hängt von der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts ab. Als Richtwert benötigt beispielsweise die *Taq* DNA - Polymerase ca. 1 Minute für die Synthese von 1000 Nukleotiden. Nach Ablauf der gewünschten Zyklen (30-35) findet in der Regel ein finaler Extensionsschritt bei 72°C für ca. 10 Minuten statt. Dieser soll die Komplettierung unvollständiger DNA-Stränge gewährleisten.

Verwendete Enzyme zur Durchführung der PCR-Reaktionen:

KOD Hot Start DNA Polymerase (Novagen®, Merck Millipore, Darmstadt)

Expand™ High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim)

DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte)

5.6.1 Optimierung der PCR-Reaktionen

Einige Hersteller bieten sogenannten Mastermix-Reagenzien an. Hier sind alle erforderlichen Komponenten in Standard Konzentration gebrauchsfertig angesetzt. Diese haben primär den Vorteil Pipettierschritte einzusparen, was das Kontaminationsrisiko senkt und zusätzlich, besonders bei Routineanwendungen, deutliche Zeitersparnisse bringen. Insbesondere für Kolonie-PCR-Analysen mit hohem Probenaufkommen wurde in dieser Arbeit auf den DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) (Fermentas; Thermo Fisher Scientific, Schwerte) zurückgegriffen. In vielen Reagenzien-Kits können die erforderlichen Komponenten, die für eine effektive PCR-Reaktion benötigt werden, einzeln hinzugefügt werden. Auf diese Weise kann durch Variation der entsprechenden Reagenzkonzentration eine Optimierung der PCR vorgenommen werden. Besonders für die Amplifikation von kritischen DNA-

Abschnitten sowie für Mutagenese-Experimente wurden DNA-Polymerasen eingesetzt, bei welchen die Konzentrationen der Einzelkomponenten angepasst werden mussten. Für die Optimierung der PCR-Ergebnisse wurden folgende Reaktionskomponenten und Parameter variiert:

Annealing-Temperatur:

Zu Beginn wurde eine Annealing-Temperatur gewählt, die ca. 5°C unter der Schmelztemperatur des Primerpaares lag. Anschließend erfolgten Temperaturanpassungen in 2°C-Schritten. Die Schmelztemperaturen der verwendeten Primer, wurden den Angaben des Herstellers (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg) entnommen.

Konzentration der Magnesium-Ionen:

Die Konzentration von Mg²⁺-Ionen im Reaktionsansatz beeinflusst den Einbau der dNTPs und hat somit direkten Einfluss auf die sogenannte Prozessivität der DNA-Polymerase. Diese beschreibt die Anzahl an Katalyseschritten des Enzyms, bevor sie von der Matrize dissoziiert. Auf diese Weise kann die Ausbeute eines Fragmentes gesteigert werden. Bei der vorliegenden Arbeit wurde bei einer Standardkonzentration von 1,5 mM MgCl₂ begonnen und bei Bedarf auf maximal 5 mM erhöht.

Primer:

Falls möglich wurden mehrere Primerpaare verwendet, da bereits Unterschiede von nur wenigen Nucleotiden das Ergebnis der PCR stark beeinflussen können. Die Kriterien, welche zur Auswahl der Primer berücksichtigt wurden, sind in 5.5 ausführlicher erläutert.

Template-Konzentration:

Für die Ermittlung der optimalen Konzentration an Template DNA für die PCR-Reaktion wurden folgende Punkte berücksichtigt:

1. Identität der eingesetzten Matrizen-DNA (Plasmid-DNA, cDNA etc.).
2. Qualität der eingesetzten DNA (photometrische Analyse).

Plasmid-DNA wurde in Konzentrationen von 100 bis 300 ng eingesetzt und für die RT-PCR wurden 10 - 50 ng der generierten cDNA verwendet.

5.7 PCR-Methoden

Für einen Standard PCR-Reaktionsansatz mit einem Volumen von 50µl, wurden die Komponenten nach folgendem Pipettierschema in einem 0,2 ml Reaktionsgefäß angesetzt:

Tab. 10: Standard PCR-Reaktionsansatz

PCR-Reagens	Volumen	Endkonzentration
DNA-Polymerase (5 U/ μ l)	0,5 μ l	0,05 Units
10 x PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl; 500 mM KCl, pH 8,4)	5 μ l	1 x
10 mM dNTP Mix	1 μ l	0,2 mM
50 mM MgCl ₂	1,5 - 5 μ l	1,5 - 5 mM
<i>Sense</i> -Primer (10 μ M)	1 - 2,5 μ l	0,2 – 0,5 μ M
<i>Antisense</i> -Primer (10 μ M)	1 - 2,5 μ	0,2 – 0,5 μ M
Template DNA mit x μ l H ₂ O auf 50 μ l Reaktionsvolumen	x μ l	2-50 ng

5.7.1 Touchdown-PCR

Mit Hilfe der *Touchdown*-PCR kann die Spezifität für ein bestimmtes DNA-Fragment entscheidend verbessert und zusätzlich die Ausbeute des gewünschten PCR-Produktes gesteigert werden (Korbie und Mattick, 2008). Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass die Spezifität der Primer-Bindung an die komplementäre Matrize mit zunehmender Temperatur steigt. Daher werden die initialen Zyklen der *Touchdown*-PCR bei *Annealing*-Temperaturen durchgeführt, die ca. 5 - 10°C über der Schmelztemperatur (T_m) der Primer liegen. Die Rate der neugebildeten DNA-Fragmente ist jedoch unter diesen Bedingungen aufgrund unzureichender Primer-Bindung herabgesetzt. Aus diesem Grund findet durch sukzessives Absenken der Temperatur (*touchdown*) in den folgenden Zyklen, ein schrittweises Herantasten an die optimale *Annealing*-Temperatur statt. Daraus resultiert eine weniger spezifische Bindung der Primer. Da während der initialen Zyklen der PCR aber in der Regel ausreichend viele spezifische DNA - Matrizen synthetisiert wurden, wird die Amplifikation der gewünschten DNA-Fragmente trotz niedrigerer Spezifität in den nachfolgenden Reaktionen begünstigt. Hierdurch kann die Synthese unspezifischer PCR-Produkte deutlich reduziert werden (Roux, 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde die *Touchdown*-PCR-Methode in vereinfachter Form (siehe Tabelle 11) durchgeführt.

Tab. 11: Standard Touchdown-PCR-Programm

Thermocycler-Programm: Touchdown-PCR		
Initiale Denaturierung	95 °C für 3 min	
1. Denaturierung	95 °C für 30 s	
2. Annealing	65 °C (- 0,2 °C pro Zyklus) für 30 s	Schritte 1 – 3 30 - 35 Zyklen
3. Extension	72 °C 1 min/1 kb DNA	
Finale Extension	72 °C 10 min	
Kühlung	4 °C ∞	

5.7.2 Ortsgerichtete Mutagenese

5.7.2.1 Ortsgerichtete Mutagenese mittels inverser PCR.

In dieser Arbeit wurden ausgehend von einem L-VvPPOcs-2-pET-51 b(+)-Konstrukt mittels inverser PCR unter Verwendung von mutagenen Primern (siehe Anhang G 2.) die Mutanten F259L, F259V und F259G erzeugt. Die gewünschten Nukleotid-Substitutionen wurden auf Grundlage eines leicht veränderten *KOD-Plus-Mutagenesis* Protokolls (Toyobo, Japan) durchgeführt. Hierbei wurde lediglich der Kinase- durch einen Ligase-Schritt ersetzt. Aus diesem Grund war es erforderlich, dass die verwendeten Primer (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg) an den jeweiligen 5'-Termini phosphoryliert waren, um eine erfolgreiche Rezirkularisierung der linearisierten PCR-Produkte durch Einsatz von T4-DNA-Ligase (Promega, Mannheim) zu gewährleisten. Die mutagenen Primer wurden jeweils in *Sense*-Orientierung (*forward*) eingesetzt. Um die Konstrukt-Matrize amplifizieren zu können, wurden die *Antisense*-Primer (*reverse*) „Rücken-an-Rücken“ zu den korrespondierenden mutagenen *Sense*-Primern gewählt. Diese spezielle Primer-Anordnung ermöglicht eine vollständige PCR-induzierte Linearisierung (inverse PCR) des Expressionskonstrukts. Auf diese Weise kann eine Verschiebung des Leserahmens nach Ligation mit T4 - DNA - Ligase vermieden werden. Nach durchgeführter PCR (20 Zyklen) unter Einsatz einer *KOD Hot Start DNA Polymerase* (Novagen®, Merck Millipore, Darmstadt) in 50 µl Reaktionsansätzen, wurden 10 µl des PCR-Produkts mittels Agarose-Gelelektrophorese (0,9 % Agarose) analysiert. Um die methylierten Wildtyp-Matrizen selektiv abbauen zu können, was die spätere Identifizierung der transformierten Mutanten erleichtert, wurden die PCR-Ansätze mit Hilfe von *DpnI* (New England Biolabs, Frankfurt) behandelt. Zu diesem Zweck wurden ca. 40 µl des PCR-Ansatzes mit 24 U *DpnI* (New England Biolabs, Frankfurt) für 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das PCR-Produkt nach Angaben des Herstellers mittels T4-DNA-Ligase (Promega, Mannheim) rezirkularisiert. Die Transformation der chemisch kompetenten One Shot® TOP10 (Invitrogen™, Life Technologies, Darmstadt) oder Novablue Singles™ (Novagen®, Merck, Darmstadt) erfolgte unter Einsatz von 2 µl des Ligationsansatzes. Um die Vollständigkeit des *DpnI*-Verdau abzuschätzen zu können, wurde ein weiterer Transformationsansatz des *DpnI*-behandelten PCR-Produkts als Kontrolle erstellt. Nach erfolgter Verifizierung der gewünschten Mutanten via DNA-Sequenzierung wurden die mutierten Vektoren in Rosetta™ 2(DE3)pLysS (Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt) transformiert.

Tab. 12: Programm für die PCR-vermittelte Mutagenese mittels inverser PCR**Thermocycler-Programm: Touchdown-PCR**

Initiale Denaturierung	94 °C für 3 min	
1. Denaturierung	98 °C für 30 s	
2. Annealing	65 °C (- 0,5 °C pro Zyklus) für 30 s	Schritte 1 – 3 20 Zyklen
3. Extension	74 °C für 6 min	
Finale Extension	74 °C 10 min	
Kühlung	4 °C ∞	

5.7.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese mittels *In-Fusion™* Klonierung

Die PCR-basierte ortsgerichtete Mutagenese auf Basis des L-VvPPOcs-3 Wildtyps erfolgte unter Anwendung des *In-Fusion™ HD cloning* Kits (Clontech-Takara Bio Europe) nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden die für die gewünschten Substitutionen benötigten mutagenen Triplets in der Mitte einer 15 bp Homologie an den 5'-Termini der jeweiligen Primer (siehe Anhang G 2.) inkorporiert. Diese waren dem *Codon-Usage* von *E. coli* angepasst. Die verwendeten Primer wurden über die Firma Invitrogen™ (Life Technologies, Darmstadt) bezogen. Als Matrize für die inverse PCR diente das L-VvPPOcs-3_pET-51b(+) – Konstrukt. Die PCR wurde mittels einer *KOD* Hot Start DNA Polymerase (Novagen®, Merck Millipore, Darmstadt) in 50 µl Reaktionsansätzen durchgeführt. Hierbei wurde ein PCR-Programm mit 30 Zyklen gewählt (siehe Tab. 13). Anschließend wurden 10 µl des PCR-Produkts gelelektrophoretisch analysiert und die methylierten parentalen Wildtyp-Matrizen des Reaktionsprodukts mit Hilfe von *DpnI* (New England Biolabs, Frankfurt) selektiv abgebaut. Dazu wurden die übrigen ca. 40 µl des PCR-Ansatzes mit 40 U *DpnI* versetzt und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die DNA-Proben unter Verwendung des *Nucleospin® PCR Clean-up* Kits der Firma Macherey-Nagel (Düren) aufgereinigt. Um die linearisierten Plasmide zu rezirkularisieren wurden ca. 10 ng des aufgereinigten PCR-Produkts in 10 µl Ansätzen mit 2 µl des *In-Fusion™ Enzyme Premix* versetzt. Die Reaktionen erfolgten in einem Thermocycler (PeqSTAR 2 x Gradient, PeqLab) bei 50°C für 15 min. Im Anschluss wurden die erhaltenen Vektoren in *Stellar™ Competent Cells* (Clontech-Takara Bio Europe) kloniert. Nach Kultivierung und anschließender Plasmidisolierung wurden die mutierten Vektoren durch die Firma StarSEQ (Mainz) sequenziert. Nach erfolgter Verifizierung wurden die mutierten Vektoren in *Rosetta™ 2(DE3) pLysS* (Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt) transformiert.

Tab. 13: Programm für die PCR-vermittelte Mutagenese

Thermocycler-Programm: Touchdown-PCR		
Initiale Denaturierung	94 °C für 2 min	
1. Denaturierung	98 °C für 30 s	
2. Annealing	65 °C (- 0,2 °C pro Zyklus) für 30 s	Schritte 1 – 3 30 Zyklen
3. Extension	74 °C für 6 min	
Finale Extension	74 °C 10 min	
Kühlung	4 °C ∞	

5.7.3 Kolonie-PCR

Um positive Klone nach der Transformation und Vorauswahl mit Hilfe von Blau-Weiß-Selektion identifizieren zu können, wurden sogenannte Kolonie-PCR-Analysen durchgeführt. Hierzu wurde der DreamTaq Green PCR Master Mix (2X) der Firma Fermentas (Thermo Fisher Scientific, Schwerte) verwendet. Die entsprechenden Reaktionsansätze wurden nach dem unten aufgeführten Pipettierschema angefertigt. Die Beimpfung eines PCR-Reaktionsansatzes erfolgte durch Aufnahme der Kolonie von einer Agarplatte mittels steriler, gestopfter Pipettenspitze und Transfer in ein PCR-Reaktionsgefäß, in welches das DEPC-H₂O vorgelegt wurde. Im Anschluss wurden die Ansätze für 5 min bei 92°C inkubiert, was den Zellaufschluss der Bakterien verbessert und falsch negative Nachweisreaktionen minimiert. Nach Abkühlung der jeweiligen Reaktionsgefäße auf Eis wurden die restlichen Komponenten des PCR-Reaktionsansatzes hinzupipettiert (siehe Tab. 14) und das entsprechende PCR-Programm gestartet.

Tab. 14: Reaktionsansatz für eine Standard Kolonie-PCR-Analyse

Reaktionsansatz der Kolonie-PCR	
6,25 µl	<i>Dream Taq Green</i> PCR Master Mix (2x)
0,5 µl	M13_for bzw. T7_Promoter Primer (10 µM)
0,5 µl	M13_rev bzw. T7_Terminator Primer (10 µM)
4,25 µl	DEPC H ₂ O
Gesamtvolumen 12,5 µl	

Für Kolonie-PCR-Analysen wurde meist ein Touchdown-PCR-Programm durchgeführt (siehe Kapitel 5.6.4).

5.8 PCR-Aufreinigung

PCR-Produkte wurden im Anschluss an die PCR von den restlichen, unverbrauchten Komponenten des PCR-Reaktionsansatzes, wie z.B. Primern und Polymerase gereinigt, da diese bei nachfolgenden Zielanwendungen interferieren können. Dazu wurde das *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet.

5.9 Elektrophoretische Trennung von Nukleinsäuren

Die Elektrophorese ist eine Analysemethode zum Nachweis und Größentrennung von Nukleinsäuren und Proteinen. Das Prinzip beruht auf der Migration geladener Teilchen in einem angelegten elektrischen Feld. Innerhalb eines festen Trägermaterials (Matrix) beeinflussen die charakteristischen Eigenschaften verschiedener Moleküle wie z.B. Konformation, Ladungsverteilung und Kettenlänge die Migrationsgeschwindigkeit im elektrischen Feld. Die Bestandteile einer Lösung können somit nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Trennung erfolgt hierbei innerhalb einer festen Gelmatrix wie z.B. Agarose oder Polyacrylamid.

Nukleinsäuren besitzen aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften eine gleichförmig verteilte negative Ladung. Hierfür ist das charakteristische Zucker-Phosphat -Rückgrat der DNA verantwortlich. Als Gelmatrix für die Elektrophorese wurde Agarose verwendet, ein aus marinen Rotalgenarten gewonnenes Polymer. Es besteht aus glykosidisch verbundener D-Galactose und 3,6-Anhydro-L-Galactose. Nach Erhitzen der Agaroselösung (in TBE-Puffer) bildet sich nach dem Aushärten eine gitterartige Matrix, deren Porengröße durch die Agarosekonzentration determiniert ist. Konformation und Länge der DNA-Fragmente beeinflussen die Migrationsgeschwindigkeit in der Gelmatrix, so dass sich kurze Fragmente schneller auftrennen lassen als hochmolekulare Polynukleotide.

Für die Elektrophoresen wurde ein horizontales System der Firma Peqlab (Erlangen) verwendet. Hierzu wurde eine konstante Spannung von ca. 8 V pro cm Elektrodenabstand (ca. 80-100 V) angelegt und Agarosegele abhängig von der erwarteten Fragmentlänge in Konzentrationen von 0,9 – 1 % verwendet. Zur Detektion der DNA mittels UV-Exposition ($\lambda = 254-366 \text{ nm}$), wurden die Gele im Anschluss an die Elektrophorese mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid versetzt. Seine planare Struktur ermöglicht ein Interkalieren in doppelsträngige und einzelsträngige DNA und RNA. Die Fluoreszenzintensität bei UV-Exposition ist hierbei proportional zur DNA- bzw. RNA-Konzentration. Dies erlaubt neben der Detektion der DNA-Banden auch eine Abschätzung der vorliegenden DNA-Menge.

Zur Vorbereitung der Gele wurde die gewünschte Menge an Agarose (0,9 – 1,0 g) durch aufkochen in 100 ml TBE-Puffer gelöst. Nach kurzem abkühlen wurde die Agaroselösung in geeignete Gelschlitten (Firma Peqlab, Erlangen) gegossen und anschließend nach erfolgtem Aushärten, in horizontale

Elektrophorese-Kammern überführt. Diese wurden zuvor mit TBE-Puffer (Laufpuffer) befüllt. Danach wurden die DNA-Proben mit Ladepuffer (6 x Loading dye, Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Um die Fragmentlängen nach durchgeführter Elektrophorese abschätzen zu können, wurde ein geeigneter DNA-Marker (GeneRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80-100 V. Im Anschluss wurden die Gele mit einem Geldokumentations-System digitalisiert und die DNA-Banden bei Bedarf zu präparativen Zwecken extrahiert.

Verwendete Reagenzien und Lösungen:

TBE-Puffer (10x)	1 M Tris-Borat und 20 mM EDTA in destilliertem, deionisiertem Wasser (pH 8,3). Dieser wurde in 10x konzentrierter Form von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen und mit VE-H ₂ O angesetzt.
Ladepuffer:	10 mM Tris-HCl; 0,03 % Bromphenolblau; 0,03 % Xylencyanol FF; 60 % Glycerol; 60 mM EDTA (Thermo Fisher Scientific, Schwerte).
Ethidiumbromidlösung:	Die Stammlösung zum Fluoreszenznachweis von Nukleinsäuren (1 %ige Lösung in Wasser; 10 mg/ml) wurde von der Firma Roth (Karlsruhe) bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt.
DNA-Marker:	GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas; Thermo Fisher Scientific, Schwerte, siehe Abb. 6)

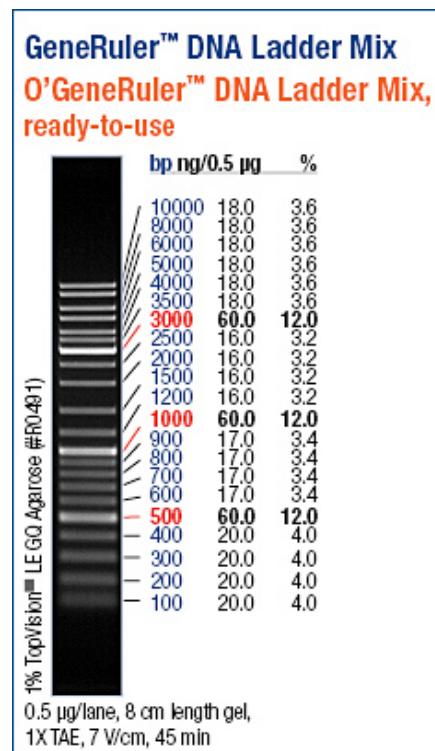


Abb.6: Verwendeter DNA-Größenstandard GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte)

5.10 Extraktion der DNA aus Agarosegelen

Nach der elektrophoretischen Separation in 0,9 – 1 %-igen Agarosegelen wurden die gewünschten DNA-Banden mit Hilfe steriler Skalpell aus den präparativen Gelen ausgeschnitten. Um irreversible DNA-Schäden zu vermeiden wurde darauf geachtet, dass die UV-Exposition so kurz wie möglich ausfiel. Die Extraktion der DNA erfolgte unter Verwendung des *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits* der Firma Macherey-Nagel (Düren) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Um die DNA-Fragmente aus den Agarosestücken isolieren zu können, wurden diese zunächst in *Binding-Puffer* gelöst und anschließend in Zentrifugenfilter mit integrierten Silikamembranen überführt. In Gegenwart von chaotropen Salzen, werden die Wasserstoffbrücken hierbei gespalten, wodurch die Hydrathülle der Nukleinsäuren gestört wird. Auf diese Weise werden die Nukleinsäuren reversibel an die Silikamembran gebunden. Um unerwünschte Substanzen entfernen zu können, wurden die DNA-Fragmente anschließend unter Einsatz von Hochsalzpuffern gewaschen. Die Elution erfolgte schließlich unter Einsatz von Niedrigsalzpuffern. Wenn aufgrund schwacher Banden äußerst geringe DNA-Mengen erwartet wurden, erfolgte die Elution der DNA unter Verwendung von 25 µl DEPC-H₂O, welches zuvor auf 70°C erhitzt wurde. Hierdurch konnte die Rückgewinnung der DNA oftmals gesteigert werden.

5.11 Klonierung

5.11.1 Klonierung von PCR-Produkten

Um bestimmte DNA-Fragmente näher charakterisieren zu können, ist es notwendig, diese zuvor in möglichst hoher Kopiezahl zu vervielfältigen und schließlich in Reinform zu isolieren. Dazu wird das gewünschte DNA-Fragment nach Amplifikation mittels PCR in einen geeigneten Plasmidvektor ligiert. Nach Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen wird die rekombinante DNA von den Wirtszellen repliziert und somit in hoher Kopiezahl vermehrt. Ausgehend von den transformierten Bakterien, welche auf einem Selektionsagar zu genetisch identischen Kolonien (Klone) heranwachsen, werden anschließend positive Klone selektiert und kultiviert. Danach können die gewünschten Plasmide aus den angelegten Über – Nacht - Kulturen isoliert werden.

5.11.2 Die TA-Klonierung

In der vorliegenden Arbeit wurde das TOPO TA Cloning® *Dual Promoter Kit* der Firma Invitrogen™ (Life Technologies, Darmstadt) unter Verwendung des pCR™II-TOPO® Vektors sowie der pGEM®-T Vektor der Firma Promega (Darmstadt) verwendet. Erstgenanntes System basiert auf der TOPO-TA-Klonierungsstrategie. Die sogenannten TOPO-Vektoren werden vom Hersteller in linearisierter Form geliefert und sind mit einer Vaccinia DNA-Topoisomerase I gekoppelt, welche die Ligation des *Inserts* in den Vektor vermittelt. Für die TA - Klonierung werden PCR-Produkte mit 3'-Desoxyadenin-Überhängen benötigt, welche z.B. unter Verwendung von *Taq*-DNA-Polymerasen während der PCR eingeführt werden. Diese Amplifikate können anschließend mittels Topoisomerase I an 3'-Desoxythymidin-Überhänge der Vektoren mittels DNA-Topoisomerase I (pCR™II-TOPO® Vektor) oder T4-DNA-Ligase (pGEM®-T Vektor) geknüpft werden.

Für die Durchführung der Klonierung wurden die PCR-Produkte zunächst mittels Gelelektrophorese separiert. Danach wurden die gewünschten DNA-Banden, extrahiert und aufgereinigt (Kapitel 5.9). Die Ligation wurde schließlich entsprechend den Vorgaben der Hersteller (siehe 5.11.3.3) durchgeführt und die Reaktionsprodukte in chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen eingebracht (siehe Kapitel 5.11.1).

5.11.3 Die gerichtete Klonierung

5.11.3.1 Spezifische DNA-Fragmentierung mittels Typ-IIP-Restriktionsendonukleasen

Um die gewünschten DNA-Fragmente in einen Plasmidvektor integrieren zu können, wurden in dieser Arbeit u.a. Restriktionsendonukleasen verwendet. Hierzu wurden die pGEM®-T Vektoren, in welche die entsprechenden *Insert*-DNA-Fragmente zuvor kloniert wurden, gemeinsam mit dem Ziel - Vektor [pET 51b(+)] mit Restriktionsenzymen vom Typ IIP (*Bam*HI und *Not*I) in einem sogenannten

Doppelverdau geschnitten. Typ IIP Restriktionsenzyme erkennen spezifische palindromische Sequenzen und hydrolysieren diese an definierter Stelle. Dabei können entweder glatte, oder überhängende Enden entstehen.

Die Restriktionsansätze wurden nach dem unten aufgeführten Pipettierschema vorbereitet und in einem Thermocycler (PeqSTAR 2 x Gradient, Peqlab, Erlangen) über Nacht bei 16°C in einem CutSmart™ Puffer (New England Biolabs, Frankfurt) durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist Tabelle 15 zu entnehmen. Bei den verwendeten HF-Enzymen handelte es sich um sogenannte High Fidelity Restriktionsendonukleasen (HF) mit reduzierter *Star*-Aktivität.

Nach erfolgter Restriktion, Aufreinigung und Dephosphorylierung (Kapitel 5.11.3.2), konnte der geschnittene pET 51b(+) Vektor und die jeweiligen *Insert*-Fragmente für die anschließende Klonierung verwendet werden. Letztgenannte wurden dazu mittels T4-DNA-Ligase (Kapitel 5.11.3.3) in den pET 51b(+) Vektor ligiert und anschließend in chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen transformiert (siehe Kapitel 5.12.1). Die positiven Klone wurden mittels Kolonie-PCR überprüft (5.7.3). Nach der Kultivierung der Bakterien wurden die rekombinanten Plasmide isoliert (5.13) und zur Überprüfung des Leserahmens sequenziert (5.14). Anschließend erfolgte die Transformation der Plasmide in die jeweiligen Expressionsstämme nach Angaben der Hersteller (5.12.1).

Tab. 15: Reaktionsansatz für den Restriktionsverdau

Restriktion: Konstrukte für pET-51b(+)-Expressionsvektor	
1 µg	<i>Insert</i> -DNA / Vektor-DNA
0,5 µl	<i>Bam</i> HI-HF® (20 KU/ml)
0,5 µl	<i>Not</i> I-HF® (20 KU/ml)
2,5 µl	CutSmart™ Buffer (10x)
x µl	DEPC H ₂ O
Gesamtvolumen 25 µl	

5.11.3.2 Dephosphorylierung des pET-51b(+)-Vektors

Um mögliche Rezirkularisierungen des linearisierten pET 51b(+) Vektors ohne des gewünschten *Insert*-Fragments zu vermeiden, wurde die Plasmid-DNA im Anschluss an die Restriktion dephosphoryliert. Hierfür wurde die Calf Intestine Phosphatase (CIP, New England Biolabs, Frankfurt) verwendet. Diese alkalische Phosphatase vermittelt die Hydrolyse freier Phosphatgruppen. Die Reaktionskomponenten sind in Tabelle 16 zusammengefasst.

Tab. 16: Reaktionsansatz für die Dephosphorylierung

Dephosphorylierung: pET-51b(+)-Expressionsvektor	
1-5 µg	Plasmid-DNA
5 µl	CIP Puffer (10x)
1 µl	CIP Enzym
x µl	DEPC H ₂ O
Gesamtvolumen 20 µl	

Nach einer Inkubation von 2 h bei 37°C, wurden die jeweiligen Reaktionsansätze mit dem *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) aufgereinigt. Um die Separation der Phosphatase von der linearisierten Vektor-DNA zu erhöhen, was die spätere Elution der DNA von der Silikamembran verbessert, wurden die erforderlichen Waschschrte unter Einsatz eines Guanidiniumhydrochlorid-haltigen Waschpuffers des *High Pure Plasmid Isolation Kits* der Firma Roche (Mannheim) vorgenommen. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde anschließend bei -20°C gelagert.

5.11.3.3 Ligation mittels T4-DNA-Ligase

Für die Ligationen der DNA-Fragmente in pGEM®-T-Vektoren (Promega, Mannheim) sowie der Rezirkularisierung von Vektoren nach PCR-induzierter Mutagenese und für die gerichtete Klonierung, wurde die T4-DNA-Ligase der Firma Promega (Darmstadt) nach folgendem Pipettierschema verwendet. Das Verhältnis der Konzentrationen von Vektor- zu *Insert*-DNA betrug hierbei ca. 1:3. Die Zusammensetzung des Ligationsansatzes ist in Tabelle 17 aufgeführt.

Tab. 17: Zusammensetzung des Ligationsansatzes

Ansatz für die Ligationsreaktionen	
25 ng	Plasmid-DNA
10 ng	<i>Insert</i> -DNA
2 µl	T4-Ligase-Puffer (10x)
1 µl	T4-DNA-Ligase
x µl	DEPC H ₂ O
Gesamtvolumen 20 µl	

5.12 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Nach Ligation der amplifizierten DNA-Fragmente in die spezifischen Plasmidvektoren, war es erforderlich, die erhaltenen rekombinanten Konstrukte zu vervielfältigen. Hierzu wurden chemisch kompetente *E. coli*-Stämme als Wirtsorganismen genutzt. Diese besitzen die Kompetenz gewünschte

Vektoren Hitzeschock-induziert aufzunehmen. Nach erfolgter Transformation wurden die eingebrachten Plasmide von den Wirtszellen in hoher Kopiezahl repliziert und konnten anschließend in hoher Reinheit isoliert werden.

5.12.1 Transformation chemisch kompetenter Bakterien mittels Hitzeschock

Für die Transformation von Fremd-Vektoren in *E. coli*-Zellen ist es notwendig, eine ausreichende Permeabilität der bakteriellen Zellmembranen zu schaffen. Dies kann durch Behandlung der Zellen mit CaCl_2 erreicht werden. In Kombination mit einem durchgeführten Hitzeschock können hierdurch kurzfristig sehr effizient Fremd-Vektoren von den Bakterienzellen aufgenommen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die chemisch-kompetenten Bakterien-Stämme One Shot® TOP10 *Chemically Competent Cells* der Firma Invitrogen™ (Life Technologies, Darmstadt), Novablue Singles™ (Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt), Stellar™ *Chemically Competent Cells* (Clontech-Takara Bio Europe), Rosetta™ 2(DE3)pLysS (Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt) und BL21 *Competent Cells* (Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt) verwendet. Für die Transformation wurden die Bakterien kurz auf Eis aufgetaut. Danach wurden 2 µl des Ligationsansatzes (Kapitel 5.10.3.3) zu 25 – 50 µl der Bakteriensuspension pipettiert und durch Rühren mit der Pipettenspitze gemischt. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurde der Transformationsansatz für 45 Sekunden bei 42°C einem Hitzeschock (Wasserbad) ausgesetzt und anschließend für 2 min auf Eis inkubiert. Nachfolgend wurde die Bakteriensuspension mit 250 µl vorgewärmtem SOC-Medium versetzt und für 1 h bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Danach wurden die Bakteriensuspensionen in unterschiedlichen Volumina (50 – 150 µl) auf einem geeigneten Selektionsagar ausgestrichen. Um ein selektives Wachstum der Bakterien zu gewährleisten, wurden die entsprechenden Antibiotika (meist Carbenicillin oder Ampicillin) eingesetzt. Für den Fall, dass eine Blau-Weiß-Selektion (siehe Kapitel 5.11.2) durchgeführt werden sollte, wurden die Agarplatten zusätzlich mit X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) und IPTG (Isopropyl-(β-D-thiogalactopyranosid) angereichert.

5.12.2 Blau-Weiß-Selektion

Zur visuellen Selektion der transformierten Bakterien wurde eine sogenannte Blau-Weiß-Selektion durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde der Selektionsagar mit den adäquaten Antibiotika sowie X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid) und IPTG (Isopropyl-(β-D-thiogalactopyranosid) supplementiert.

Plasmide, welche für die Blau-Weiß-Selektion geeignet sind, besitzen eine β-Galactosidase-Kassette (LacZα). In diese ist die MCS (engl. *multiple cloning site*) des Vektors inkorporiert, so dass der Leserahmen nicht unterbrochen wird. Auf diese Weise kann das α-Peptid als intaktes Fusionsprotein synthetisiert werden und Kolonien, welche Vektoren ohne *Insert* tragen, färben sich in Gegenwart von

X-Gal und IPTG blau (α -Komplementation). Wird jedoch ein DNA-Fragment in die MCS integriert, führt dies in der Regel zu einem dysfunktionalen LacZ α -Gens und die jeweiligen Kolonien färben sich nicht (weiße Kolonien). Auf diese Weise können potentiell positive Klone visuell vorselektiert und anschließend mittels Kolonie-PCR identifiziert werden.

5.13 Isolierung von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA aus den transformierten *E.coli*-Zellen isolieren zu können, wurde das *High Pure Plasmid Isolation Kit* der Firma Roche (Mannheim) oder das *NucleoSpin Plasmid Kit* der Firma Macherey-Nagel (Düren) verwendet. Das zugrunde liegende Trennprinzip ist eine sogenannte Festphasenextraktion (engl. solid phase extraction). Als feste Phase (Sorbens) kommen im Allgemeinen Silikamembranen zum Einsatz, welche in Mikrozentrifugen-Säulen integriert sind. In Gegenwart von SDS, welches Bestandteil der verwendeten Puffer ist, werden die Bakterienzellen alkalisch lysiert und die Plasmid-DNA mit Hilfe der Mikrozentrifugen-Säulen von den übrigen Zellbestandteilen getrennt. Mittels Ethanol-haltiger Hochsalzpuffer erfolgt im Anschluss die Anreicherung und Reinigung der DNA auf der Säule. Durch Zugabe eines Niedrigsalzpuffers, oder H₂O kann die DNA anschließend von der Säule eluiert werden. Die Durchführung der einzelnen Schritte erfolgte nach den Angaben und Empfehlungen der jeweiligen Hersteller.

5.14 Sequenzanalyse

5.14.1 Computergestützte Sequenzanalyse

Die klonierten DNA-Fragmente wurden nach erfolgter Plasmidisolierung von der Firma StarSEQ GmbH (Mainz) sequenziert. Hierzu wurden 400-600 ng Plasmid-DNA mit einer 10 μ M Primerlösung (*Sense*- oder *Antisense*-Orientierung) versetzt. Im Anschluss an die Sequenzierung wurden die Sequenz-Rohdaten in elektronischer Form von der Firma StarSEQ erhalten. Die Auswertung der entsprechenden Elektropherogramme erfolgte mit dem frei erhältlichen Programm FinchTV (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.html>). Hiermit wurde zunächst die Qualität der Sequenzdaten überprüft. Bestimmte Teilbereiche, die durch Signalinterferenzen gekennzeichnet waren, konnten gegebenenfalls mit Hilfe eines Vergleichs mit redundant erzeugten Fragmenten editiert werden. Im Anschluss wurden die überprüften DNA-Fragmente zur weiteren Analyse genutzt. Für den Fall, dass vektorspezifische Primer bei der Sequenzierung zum Einsatz kamen, mussten die vorhandenen Vektorflanken entfernt werden. Zu diesem Zweck kamen die Programme Geneious (www.geneious.com/) und BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html) zum Einsatz. Zur Identifizierung der Teilsequenz bzw. um erste nähere Informationen über die Identität der ermittelten

Sequenzdaten zu bekommen, wurde mit dem Suchalgorithmus BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) ein Datenabgleich mit der Nukleotid-Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) vorgenommen. Dies ermöglicht den Zugriff auf diverse Quellen, wie GenBank, RefSeq, TPA und PDB und wurde bei der Suchanfrage auf *Viridiplantae* eingeschränkt. Zusätzlich erfolgte ein Datenabgleich mit Referenz-PPOs aus *V. vinifera*. Die Sequenzabschnitte, die auf diese Weise identifiziert werden konnten, wurden mit Hilfe der Programme Geneious und BioEdit zu sogenannten Contigs (durchgehende „contiguous“ DNA-Sequenzen) assembliert. Mit Hilfe des Online-Tools Translate des ExpASY (Expert Protein Analysis System) Portals (www.web.expasy.org/translate/) wurden die Nukleotidsequenz-Daten im Anschluss in die möglichen Leseraster translatiert und der richtige Leserahmen mit Hilfe bereits gewonnener Daten festgelegt. Hierzu wurden die entsprechenden Sequenzen mit Referenz-Gen-Sequenzen von PPOs aus *V. vinifera* und anderen pflanzlichen PPOs unter Verwendung von ClustalW (www.clustal.org/) oder Muscle (Edgar, 2004) aligniert. Mit Hilfe der erstellten Alignments wurden besonders Gen-Bereiche analysiert, die auch speziesübergreifend konserviert waren und somit ein Anhaltspunkt für bekannte Struktur-Motive waren. Die Alignments wurden anschließend mit dem Programm GeneDoc (www.nrbsc.org/gfx/genedoc/) graphisch bearbeitet.

5.14.2 Sequenzierung mit vektorspezifischen Primern

Hierfür wurden die DNA-Fragmente zunächst via TA-Klonierung (siehe Kapitel 5.11.2) in einen geeigneten Plasmidvektor integriert und in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen eingebracht. Um die inserierten DNA-Bereiche verifizieren zu können, wurden die erhaltenen Vektoren mit vektorspezifischen Primern (M13 bzw. T7 siehe Anhang G2.) bidirektional sequenziert.

5.14.3 Verwendete Programme und Datenbanken

Für die Auswertung und Analyse der Sequenzdaten sowie für das Design und die Analyse der in dieser Arbeit verwendeten Primer, wurden im Internet frei erhältliche Programme, Dienste und Datenbanken verwendet. Diese sind mit Name und Internet-Adresse im Anhang aufgelistet.

6. Bioinformatische Methoden

6.1 Homologiemodellierung (MODELLER)

Für Proteine (Zielproteine) bei welchen es keine detaillierten Strukturinformationen gibt, bietet das Programm MODELLER die Möglichkeit, auf Grundlage generierter Sequenzalignments mit homologen Proteinstrukturen (*Templates*, meist Kristallstrukturen) eine abgeleitete Raumstruktur (Homologiemodell) zu ermitteln (Sali und Blundell, 1993). Zu diesem Zweck wird die Primärstruktur

des Zielproteins zunächst mit der PDB-Datenbank abgeglichen (BLAST-Suche), um geeignete homologe *Templates* mit möglichst hoher Sequenzidentität zu identifizieren. Auf Grundlage der Polypeptidkette des Zielproteins und den kartesischen Koordinaten des gewählten *Templates*, kann anschließend durch das Programm MODELLER ein dreidimensionales Modell berechnet werden. Hierbei erfolgt die Anpassung an die konservierten Bereiche des *Templates*, wobei spezifische Diederwinkel und Bindungslängen einkalkuliert werden.

Die Homologiemodellierungen der in dieser Arbeit vorgestellten Strukturen sequenzierter N-terminaler Domänen von PPO-Isoformen aus *V. vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon wurden auf Basis der Struktur von VvPPOg (PDB-ID: 2P3X; *V. vinifera* L. cv. Grenache) mit dem Programm Modeller Version 9.15 erstellt. (Virador et al., 2010). Die Generierung von C-terminalen Domänen erfolgten auf Grundlage von CgAUS1 aus *C. grandiflora* (PDB-ID: 4Z12). MODELLER ist frei verfügbar und kann über <http://salilab.org/modeller/> bezogen werden.

6.2 Chimera

UCSF Chimera ist ein erweiterbares Programm zur visuellen 3D-Analyse- und Bearbeitung von molekularen Strukturen, wie 3D-rekonstruierte Kristallstrukturen und EM-basierte Elektronendichtekarten (Pettersen et al., 2004; Goddard et al., 2007). Dieses Programm bietet vielschichtige Bearbeitungsmöglichkeiten. So können beispielsweise Homologiemodelle mittels einer implementierten Modeller-Schnittstelle erstellt oder multiple strukturbasierte Alignments generiert werden. Es können aber auch Strukturänderungen, wie z.B. Änderungen der Rotamere etc. durchgeführt werden.

Chimera ist ein frei erhältliches Programm und kann über <http://plato.cgl.ucsf.edu/chimera/> bezogen werden.

7. Rekombinante Expression

7.1 Rekombinante Expression von Fusionsproteinen in *E. coli*

Mit Hilfe der rekombinanten Genexpression können gezielt große Mengen eines gewünschten Proteins *in vivo* synthetisiert werden. Als Wirtsorganismus wurde in dieser Arbeit das Bakterium *E. coli* genutzt. Hierfür wurden die spezifischen PPO-kodierenden Ziel - Gene in geeignete Expressionsvektoren ligiert und diese via Transformation in die gewünschten Expressionsstämme eingebracht. Die Expression erfolgte hierbei abhängig vom verwendeten Kulturmedium entweder durch Autoinduktion nach Studier et al. (2005) in einem ZYM-5052-Medium und *Overnight Express™ Instant* LB-Medium (Novagen®, Merck, Darmstadt) oder wurde in LB-Medium manuell durch Zugabe von IPTG induziert. Um die gewünschten rekombinanten Proteine möglichst in Reinform gewinnen zu können, wurden

diese als Fusionsproteine mit sogenannten Affinitäts-Tags versehen. Diese ermöglichen eine effektive reversible Immobilisierung des rekombinanten Fusionsproteins auf geeigneten Trägermatrizen (Affinitätsmatrizen) und können nach durchgeführten Waschschritten unter Einsatz spezieller Elutionspuffer von der Affinitätsmatrix eluiert werden. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden für die rekombinante Expression von PPOs aus *V. vinifera* zwei verschiedene N-terminal lokalisierte Affinitäts-Tags verwendet:

- 6xHis-Tag System
- Strep-Tag® II (WSHPQFEK)

Die rekombinante Expression von Strep-Tag II Fusionsproteinen erfolgte unter Verwendung zweier unterschiedlicher Expressionssysteme. Zum einen wurde ein pTrcHis2-TOPO® Vektor (Invitrogen™, Life Technologies, Darmstadt) in Kombination mit BL21 *Competent Cells* (Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt) verwendet. Hier wurde die entsprechende kodierende Sequenz für den Strep-Tag II zusammen mit einer Enterokinase-Schnittstelle an das 5'-Ende des spezifischen *Inserts* fusioniert. Durch zusätzliches Einführen eines Terminationscodons an das 3'-Ende des Ziel-Gens, wurde dieses ohne ein C-terminalen His-Tag exprimiert. Die Kultivierung erfolgte bei 37°C für 6 h.

Zum anderen kam ein pET-51 (+) Vektor in Kombination mit Rosetta™ 2(DE3)pLysS (Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt) zum Einsatz. Hier erfolgte die Expression in einem ZYM-5052 Medium, oder *Overnight Express™ Instant LB Medium* (Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt) und wurde für einen Zeitraum von 48 h bei 24-26°C durchgeführt.

Für die rekombinante Expression der His-Tag-Fusionsproteine wurde ein pTrcHis-Vektor (Invitrogen™, Life Technologies, Darmstadt) verwendet. Die Proteinproduktion erfolgte hierbei analog zum pTrcHis2-Konstrukt.

7.1.1 Rekombinante Expression mittels pTrcHis-TOPO® TA und pTrcHis2-TOPO® TA

Vektor

Der pTrcHis-TOPO® Vektor (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt) ist ein Expressionsvektor, welcher speziell für hohe Expressionsraten von Proteinen in *E. coli* entwickelt wurde. Er kodiert für einen N-terminalen Polyhistidin-Tag (6x - His), der eine effektive Aufreinigung mittels Ni-NTA Matrix erlaubt. Zudem kann das Fusionsprotein über ein anti-His (N-term) Antikörper via Western-Blot detektiert werden. Die Genexpression des *Inserts* wird über einen *trc* (*trp-lac*) Promotor mit einer hohen Transkriptions-Initiationsaktivität gesteuert (Egon et al., 1983). Hierdurch können potentiell sehr hohe Expressionsraten erzielt werden.

Neben dem pTrcHis-TOPO® Vektor wurde zusätzlich mittels einem pTrcHis-2-TOPO® Vektor eine zweite Konstruktvariante erstellt. Hierzu wurde mittels gestaffelter PCR-Reaktionen unter Verwendung des Expand High Fidelity PCR Systems der Firma Roche (Mannheim) und geeigneten Primern (siehe Anhang G 2.) der kodierende Bereich für einen Strep-Tag II sowie einer Enterokinase-Schnittstelle sukzessive an das 5'-Ende des Ziel-Gens fusioniert. Zudem wurde das 3'-Ende des *Inserts* mit einem Terminationscodon (TGA) versehen. Die mittels Gelextraktion gereinigten Amplifikate wurden anschließend in einen pTrcHis2-TOPO® Vektor ligiert.

Expressionsprotokoll

Der pTrcHis TOPO® Vektor sowie der pTrcHis2 TOPO® Vektor wurden in linearisierter Form vom Hersteller bezogen und die jeweiligen Ziel - Gene mittels TOPO-TA-Klonierung integriert (Kapitel 5.10.2). Anschließend wurde das Ligationsprodukt in One Shot® TOP10 (Invitrogen™, Life Technologies, Darmstadt) Zellen transformiert. Dabei wurde exakt nach Angaben des Herstellers verfahren. Nachdem die transformierten Bakterien auf geeigneten Selektionsagarplatten (50 µg/ml Carbenicillin) ausgestrichen und bei 37°C kultiviert wurden, erfolgte die Identifizierung von positiven Klonen mittels Kolonie-PCR. Ausgehend von den ausgewählten Klonen, wurde die Plasmid-DNA anschließend aus angelegten Über-Nacht-Kulturen (siehe 4.3) isoliert und via DNA – Sequenzierung (StarSEQ, Mainz) überprüft. Für die Expressionsversuche wurden die verifizierten Vektoren schließlich in BL21 *Competent Cells* (Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt) eingebracht.

Um das Expressionsprofil des gewünschten Ziel- Proteins determinieren zu können, wurden sogenannte Pilotexpressionen durchgeführt. Hierzu wurden die aus der Transformation erhaltenen Klone von der Agarplatte gepickt, mittels Kolonie-PCR identifiziert und entsprechende Über-Nacht-Kulturen erstellt. Für die Expression wurden 20-100 ml LB-Medium (supplementiert mit 50 µg/ml Carbenicillin und 25 µM CuCl₂) mit 500 µl der ausgewählten Über-Nacht-Kultur beimpft. Die Kultivierung wurde erneut bei 37°C durchgeführt. Nach Erreichen eines OD₆₀₀-Werts von ca. 0,6 (mid-log Phase) wurde die erste Fraktion (1 ml) entnommen. Diese wurde in einer Tischzentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus, Hanau) bei maximaler Geschwindigkeit für ca. 30 s zentrifugiert und der Überstand verworfen. Für die Abschätzung des Expressionsprofils wurde diese Probe als nicht-induzierter Ansatz für spätere SDS-PAGE-Analysen bei -20°C gelagert. Die Induktion des übrigen Expressionsansatzes erfolgte durch Zugabe von 1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid). Die Kultivierung wurde ebenfalls bei 37°C durchgeführt. Die Probenentnahme für die Pilotexpression erfolgte in einem Zeitintervall von 1 h jeweils in 1 ml Fraktionen. Diese wurden zentrifugiert und bei -20°C gelagert. Im Anschluss wurden die erhaltenen Pellets in Lysis-Puffer resuspendiert, auf Eis sonifiziert und schließlich erneut zentrifugiert. Um die Löslichkeit des rekombinanten Fusionsprotein ermitteln zu können, wurden die erhaltenen Überstände und Pellets mittels SDS-PAGE analysiert.

Für die Expression größerer Proteinmengen, welche anschließend mit Hilfe von Affinitätschromatographie aufgereinigt werden sollten, wurde das Volumen der Expressionsansätze auf 1 l erhöht und in 2 l Erlenmeyer-Schikanekolben durchgeführt.

7.1.2 Rekombinante Expression mittels pET-51b(+) Vektor

Das pET-System wird über einen T7 Promotor gesteuert und ist in Verbindung mit einer wirtskodierten T7-RNA-Polymerase ein sehr effektives Expressionssystem für die rekombinante Expression von Proteinen in *E. coli*. Der pET-51 b(+) Vektor (Novagen®, Merck Millipore, Darmstadt) kodiert u.a. einen N-terminalen Strep-Tag® II (WSHPQFEK).

Der pET-51b(+) Vektor wurde in geschlossener Form vom Hersteller bezogen. Die entsprechenden *Inserts* wurden mittels gerichteter Klonierung unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Not*I in den Vektor kloniert. Hierzu wurden den entsprechenden *Inserts* zunächst mittels PCR die *Bam*HI Restriktionsstellen an die 5'-Enden fusioniert. Dazu wurde das Expand High Fidelity PCR System der Firma Roche (Mannheim) unter Verwendung geeigneter Primer (siehe Anhang G 2.) genutzt und die erzeugten Amplifikate anschließend in pGEM®-T (Promega, Mannheim) Vektoren kloniert. Nach erfolgter Transformation in One Shot® TOP10 (Invitrogen™, Life Technologies, Darmstadt) oder Novablue Singles™ (Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt) Zellen, wurden die Plasmide isoliert und mittels DNA-Sequenzierung durch die Firma StarSEQ (Mainz) überprüft. Die entsprechenden Vorbereitungen für die Klonierung der *Inserts* in den pET-51 b(+) Vektor sind in den Kapiteln 5.11.3.1, 5.11.3.2 und 5.11.3.3 detailliert beschrieben. Nach erfolgter Verifizierung wurden die Vektoren exakt nach Angaben des Herstellers in die chemisch kompetenten Bakterien Rosetta™ 2(DE3)pLysS (Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt) transformiert. Anschließend wurden die Bakteriensuspensionen auf Agarplatten ausgestrichen, welche zuvor mit den geeigneten Antibiotika (50 µg/ml Carbenicillin, 32 µg/ml Chloramphenicol) und 1 % Glucose versetzt wurden und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach erfolgter Kultivierung wurden die Klone von den Platten gepickt, mittels Kolonie-PCR überprüft, in 5 ml LB-Medium (50 µg ml⁻¹ Carbenicillin, 32 µg/ml Chloramphenicol, 1 % Glucose) überführt und erneut über Nacht bei 37°C inkubiert. Aus den erstellten Über-Nacht-Kulturen wurden für die langfristige Konservierung, Glycerin-Kulturen hergestellt. Diese wurden bei -80°C gelagert.

Die Expression erfolgte mittels Autoinduktion, entweder unter Einsatz eines ZYM-5052 Mediums nach Studier et al. (2005) oder wurde mit Hilfe eines *Overnight Express™ Instant LB Medium* (Novagen®, Merck, Darmstadt) durchgeführt. Die verwendeten Medien wurden zusätzlich mit 100 µg/ml Carbenicillin, 32 µg/ml Chloramphenicol und 250 – 300 µM CuCl₂ versetzt. Anschließend wurden die Medien mit 500 µl einer Über-Nacht-Kultur beimpft. Die Expression erfolgte in 1 l Ansätzen und wurde in 2 l Erlenmeyer-Schikanekolben für 48 h bei 24 -26° C durchgeführt.

8. Proteinbiochemische Methoden

8.1 Aufreinigung der rekombinanten Proteine mittels Affinitätschromatographie

Die in der vorliegenden Arbeit rekombinant erzeugten Fusionsproteine wurden mittels Affinitätschromatographie über Hexahistidin-Tags (6xHis-Tag), oder Strep Tag II aufgereinigt.

8.1.1 Reinigung der nativen His-Fusionsproteine mittels Immobilisierte-Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC)

Das zugrunde liegende Funktionsprinzip der hier verwendeten Säulenchromatographie beruht auf der spezifischen Immobilisierung der His-Tag-Fusionsproteine an Nickel-Ionen, welche durch den Chelatbildner Nitrilotriessigsäure (NTA) koordiniert werden. Letztgenanntes ist kovalent mit dem Matrixmaterial Agarose verknüpft. Nach Inkubation der Säulenmatrix mit geklärtem Lysat, können unspezifisch gebundene Wirtsproteine durch Einsatz geeigneter Waschpuffer, welche mit Imidazol (20 - 50 mM) versetzt sind, von den Säulen gewaschen werden. Nach erfolgten Waschschritten werden die immobilisierten rekombinanten Fusionsproteinen unter Verwendung spezifischer Elutionspuffer (150 - 250 mM Imidazol) von der Trägermatrix eluiert.

Vorbereitung der Säule:

Die in dieser Arbeit durchgeführte Affinitätschromatographie erfolgte nach dem *Gravity-Flow*-Verfahren. Dazu wurden 5 ml Polypropylen-Säulen (Thermo Scientific™ Pierce, Bonn) mit 2 ml 50 % Ni-NTA-Agarose-Suspension nach Vorgaben des Herstellers befüllt. Nach Durchfluss des Aufbewahrungspuffers betrug das Volumen der Matrix ca. 1 ml. Im Anschluss wurde die Trägermatrix mit Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) equilibriert (5-faches Säulenvolumen). Danach wurden die Säulen bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

Zellaufschluss und Herstellung der geklärten Zelllysate:

Die *E. coli*-Zellen wurden nach der Kultivierung durch Zentrifugation bei 5000 g für 15 min in einer Sorvall RC-5B Standzentrifuge (Du Pont Instruments, Wilmington, USA) pelletiert. Um die erhaltenen Pellets von Mediumrückständen sowie überschüssigem CuCl₂ weitestgehend zu befreien, wurden diese in Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) resuspendiert, bei 5.000 g zentrifugiert und die Überstände anschließend verworfen. Darauf folgte eine erneute Resuspension der Pellets in Lysepuffer. Hierfür wurde pro g Pellet 5 ml Puffer verwendet. Danach wurden die Bakteriensuspensionen bei -20°C eingefroren und gelagert.

Die Lyse der Zellen wurde anschließend durch langsames Auftauen auf Eis initiiert. Zusätzlich wurden die Suspensionen mit Lysozym (1 mg/ml, Novagen®, Merck Millipore, Darmstadt) versetzt und für

mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Sonifikation (10 - 20 Pulse für jeweils 10 s) der Zellen ebenfalls auf Eis. Um die Viskosität der Lysate zu verringern, wurden diese nach dem Sonifizieren mit 25 U/ml Benzonase® (Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt) behandelt und für ca. 15 - 20 min bei RT inkubiert. Nachfolgend wurden die Lysate in einer auf 4°C temperierten Standzentrifuge (Sorvall RC-5B, Du Pont Instruments, Wilmington, USA) für 20 min bei 17.000 g zentrifugiert. Die erhaltenen klaren Überstände (geklärte Lysate) konnten nach Filtration mit Hilfe von Rotilabo®-Spritzenfiltern der Firma Roth (Karlsruhe) mit einer Porengröße von 0,45 µm und 0,22 µm für die Affinitätschromatographie genutzt werden.

Aufreinigung:

Im Anschluss an den Zellaufschluss wurden die geklärten Zelllysate auf die vorbereiteten, gekühlten Säulen gegeben und diese für 3 h bei 4°C unter leichter Bewegung inkubiert. Danach wurden die Lysate drainiert und eine Probe des Durchflusses für spätere SDS-PAGE-Analysen aufbewahrt. Hierauf folgte das Waschen der Säule mit den jeweiligen Waschpuffern (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 30 - 50 mM Imidazol). Zu diesem Zweck wurden die Säulen jeweils 2-mal mit dem 5-fachen Säulenvolumen an Waschpuffer (Waschpuffer 1-3, siehe unten) gewaschen und die erhaltenen Durchflüsse für SDS-PAGE-Analysen aufbewahrt. Die immobilisierten His-Fusionsproteine wurden schließlich unter Verwendung von Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol) von der Matrix eluiert. Dies erfolgte in drei Schritten mit jeweils dem 2-fachen des Säulenvolumens.

Puffer für die Säulenchromatographie:

Lysepuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0)

Waschpuffer 1 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 30 mM Imidazol, pH 8,0)

Waschpuffer 2 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 40 mM Imidazol, pH 8,0)

Waschpuffer 3 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 50 mM Imidazol, pH 8,0)

Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol, pH 8,0)

8.1.2 Reinigung der nativen rekombinanten Proteine mittels Strep-Tactin

Affinitätschromatographie

Das Funktionsprinzip der Aufreinigung von Strep-Tag II-Fusionsproteinen beruht auf der hochaffinen Bindung des Tags (WSHPQFEK) an Strep-Tactin®, welches sich von Streptavidin ableitet. Mit Hilfe der Affinitätschromatographie unter Verwendung von Strep-Tactin® Superflow™ Agarose (Novagen®, Merck Millipore, Darmstadt) als Matrixmaterial, werden die rekombinanten Proteine sehr effektiv immobilisiert. Zudem können unspezifisch gebundene Wirtsproteine mit Hilfe eines Waschpuffers entfernt und die gewünschten rekombinanten Fusionsproteine schließlich, unter Verwendung eines

Desthiobiotin-haltigen (2,5 mM) Elutionspuffer, von der Trägermatrix eluiert werden. Auf diese Weise können potentiell sehr reine Proteinlösungen gewonnen werden. Die Affinitätschromatographie wurde unter Verwendung von Strep-Tactin® Superflow™ Agarose sowie dem dazugehörige Puffer Kit der Firma Novagen® (Merck Millipore, Darmstadt) durchgeführt.

Zellaufschluss und Herstellung der geklärten Zelllysate:

Ausgehend von der Expression auf Basis des pTrcHis2- und pET-51 b (+)-Konstrukts, erfolgte die Herstellung der geklärten Lysate aus den kultivierten BL21 und Rosetta™ 2 (DE3) pLysS Zellen analog zu 8.1.1. Hierbei wurde jedoch für das Waschen der Pellets und der nachträglichen Resuspension auf einen Strep-Tactin® Waschpuffer zurückgegriffen. Des Weiteren wurde bei den kultivierten Rosetta™ 2 (DE3) pLysS Zellen auf die Zugabe von Lysozym verzichtet.

Vorbereitung der Säule:

Die Säulenchromatographie erfolgte ebenfalls mit Hilfe des *Gravity-Flow*-Verfahrens. Dazu wurde eine 5 ml Polypropylen-Säule (Thermo Scientific™ Pierce, Bonn) mit 4 ml einer 50 % Strep-Tactin® Superflow™ Agarose-Suspension (Novagen®, Merck Millipore, Darmstadt) versehen. Hierbei wurde nach Vorgaben des Herstellers verfahren. Das Endvolumen der Agarosematrix betrug nach Abfluss des Aufbewahrungspuffers ca. 2 ml und wurde anschließend mit Strep-Tactin® Waschpuffer (Novagen®, Merck Millipore, Darmstadt) equilibriert. Für die Aufreinigung unter nativen Bedingungen wurden alle verwendeten Puffer bei 4°C vorgekühlt und die jeweiligen Arbeitsschritte auf Eis durchgeführt.

Aufreinigung:

Für die Aufreinigung der erzeugten Strep-Tag II-Fusionsproteine wurden die erhaltenen geklärten Lysate jeweils in Fraktionen, die dem 4-5-fachen des Säulenvolumens entsprachen, beladen. Nach Durchfluss des Lysats wurde die Trägermatrix mit dem 5-fachen Säulenvolumen an Waschpuffer gewaschen. Diese beiden Schritte wurden für den Rest des Lysats, alternierend durchgeführt. Anschließend erfolgte die Elution des rekombinanten Fusionsproteins mit dem 6-fachen des Säulenvolumens an Elutionspuffer. Die erhaltenen Eluate wurden schließlich mittels Ultrafiltration (siehe 8.3) angereichert und der Elutionspuffer gegebenenfalls durch andere Puffersysteme ersetzt.

Puffer für die Säulenchromatographie:

- Strep-Tactin® Waschpuffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8,0)
- Strep-Tactin® Elutionspuffer (100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin, pH 8,0)

8.3 Anreicherung von Proteinen durch Ultrafiltration

Mit Hilfe der Ultrafiltration lassen sich Substanzen und Partikel, deren Größe sich im makromolekularen Bereich befindet, durch den Einsatz spezieller Membranen aus Lösungen abtrennen. Diese Methode beruht auf dem Prinzip, dass niedermolekulare Proteine bei Zentrifugation der Filtereinheiten die eingesetzten Membranen passieren können, während sich hochmolekulare Proteine im Überstand anreichern. Dies kann zum Aufkonzentrieren von Lösungen, oder zum Austausch von Puffersystemen genutzt werden. Für die Anreicherung von Proteinlösungen sowie für den gezielten Pufferaustausch wurden Amicon® Ultra Zentrifugen-Filtereinheiten der Firma Merck Millipore (Darmstadt) verwendet. Je nach Verwendungszweck wurden diese in verschiedenen Volumengrößen und nominalen Molekulargewichtsgrenzen von 10 kDa bzw. 30 kDa eingesetzt. Die Anwendung dieser Filter erfolgte exakt nach den Angaben und Empfehlungen des Herstellers.

8.4 Spektroskopische Methoden

8.4.1 Quantifizierung von Proteinen mittels UV/Vis-Spektroskopie

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurden UV/Vis-Spektren in einem Spektralbereich von 250-600 nm aufgenommen. Der Proteingehalt homogener Proteinlösungen kann nun anhand der gemessenen optischen Dichte bei 280 nm (OD_{280}) und bekanntem spezifischen molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{280} , dem Lambert-Beer'schen-Gesetz folgend, berechnet werden. Unter Verwendung des Onlinedienstes ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) ergab sich beispielsweise für das rekombinante L-VvPPOcs-2-Fusionsprotein unter Berücksichtigung eines N-terminalen Strep-Tag II (WSHPQFEK) sowie einer zusätzlichen Enterokinase-Schnittstelle (DDDDK) ein ermittelter Extinktionskoeffizient von $\epsilon_{280} = 82655 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Für eine theoretische Molekülmasse von 58,9 kDa ergab sich daher für 1 mg/ml Protein eine OD_{280} von 1,4.

8.4.2 Circulardichroismus-Spektroskopie

Für die Analyse von Proteinen ist die Circulardichroismus-Spektroskopie (CD - Spektroskopie) eine zuverlässige Methode, um die relative Verteilung von Sekundärstrukturelementen innerhalb der Tertiärstruktur eines bestimmten Proteins abschätzen zu können. Zudem liefern Abweichungen vom spezifischen CD-Fingerprints der nativen Tertiärstruktur, einen sicheren Hinweis auf mögliche Konformationsänderungen oder Fehlfaltungen.

Das Messprinzip beruht hierbei auf der selektiven Absorption von links- und rechtspolarisiertem Licht eines chiralen Chromophors. Die wichtigsten chromophoren Gruppen eines Proteins umfassen die Peptidbindung ($\leq 240 \text{ nm}$), die aromatischen Seitengruppen (260 – 320 nm), Disulfidbrücken ($\sim 260 \text{ nm}$) und spezifische Kofaktoren (z.B. Hämgruppen).

Für die Analyse von Sekundärstrukturen werden Absorptionen der Peptidbindungen im Bereich von 220 nm ($n \rightarrow \pi$ Übergänge) und 190 nm ($\pi \rightarrow \pi^*$ Übergänge) berücksichtigt. Diese werden durch die spezifischen Torsionswinkel (Φ und Ψ) des Proteinrückgrats beeinflusst (Greenfield und Fasman, 1969).

Um den *CD-Fingerprint* des L-VvPPOcs-2-Wildtyps und der Muteine (F259L, F259V und F259G) vergleichen zu können, wurden die Spektren in einem Spektralbereich von 190 – 260 nm an einem Jasco J-815 CD-Spektrometer (JASCO Labor- und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt) am Institut für Biochemie (Prof. Dr. Schneider, JGU Mainz) aufgenommen. In diesem spezifischen Spektralbereich dominieren die α -helikalen Bereiche der Proteine, während β -Faltblattstrukturen und die ungeordneten Schleifenbereiche ein weitaus niedrigeres Signal aufweisen.

Für die Einzelmessungen wurden die Proteinproben in einem 20 mM Phosphatpuffer pH 7,6 und in einer Konzentration von 0,2 mg/ml verwendet. In den Versuchen kamen Quarzküvetten mit einer optischen Weglänge von 1 mm zum Einsatz. Die Messtemperatur betrug 20°C. Jedes Spektrum wurde in Dreifachbestimmung aufgenommen und von der Gerätesoftware gegen den Leerwert des Puffers korrigiert und gemittelt. Im Anschluss wurden die Spektren der drei Muteine auf das Spektrum des L-VvPPOcs-2-Wildtyps normiert.

8.5 Polyacrylamidgelelektrophorese

8.5.1 Diskontinuierliche SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) ist eine spezielle Form der Gelelektrophorese, bei der die elektrophoretische Trennung von Proteinmolekülen in einer gitterartigen Matrix aus Polyacrylamid unter Einfluss des anionischen Detergens SDS (Natriumdodecylsulfat) erreicht wird. Die Porenstruktur der Matrix lässt sich über den Acrylamid-Anteil des Gels individuell an die erwartete Größe der aufzutrennenden Proteine anpassen. Durch Einfluss von SDS und durch Hitzebehandlung werden die Proteine denaturiert. Zudem bewirkt die Zugabe von β -Mercaptoethanol und anderen Reduktionsmitteln die reduktive Spaltung von Disulfidbrücken, wodurch sich die Proteinproben im Idealfall vollständig entfalten. Des Weiteren induziert die Anlagerung des SDS an die denaturierten Proteine eine Maskierung der spezifischen Eigenladungen, woraus negative Nettoladungen resultieren. Hierbei ist die Ladung proportional zur Masse des jeweiligen Proteins. Auf diese Weise lässt sich die molekulare Masse eines Analyts, unter Verwendung eines geeigneten Proteinmarkers, zuordnen und abschätzen. Dieses Analyseverfahren wurde durchgeführt, um die vorliegenden rekombinanten Proteine näher zu charakterisieren. Mit Hilfe dieser Methode konnten Rückschlüsse auf die Qualität und Zusammensetzung der Proteinproben getroffen werden.

Vorbereitung der Proben:

Zur Vorbereitung der Proben wurden die Proteinlösungen mit adäquaten Mengen an Roti®-Load (4x konzentrierte Stammlösung) der Firma Roth (Karlsruhe) versetzt, welcher als reduzierender Ladepuffer β -Mercaptoethanol enthält. Anschließend wurden die Proben bei 95 °C für 10 min in einem Heizblock inkubiert. Danach wurden die entsprechend vorbereiteten Gele beladen.

Durchführung:

Bei der Durchführung wurden die vorgefertigten NuPAGE® Novex® Bis-Tris 1,0 mm Polyacrylamidgele und das zugehörige XCell Sure Lock™ Mini-Cell Electrophoresis System der Firma Life Technologies (Darmstadt) verwendet. Je nach Verwendungszweck kamen dabei Gele unterschiedlicher Spurengrößen (10 well bis 15 well) und Polyacrylamid-Anteilen (10 %, 12 % und 4 – 12 %) zum Einsatz. Als Laufpuffer wurde der NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X) der Firma Life Technologies (Darmstadt) verwendet. Die Vorbereitung der Gele sowie der Laufpuffer und der Elektrophorese-Apparatur erfolgte exakt nach den Vorgaben des Herstellers.

Zusätzlich kamen eigens angefertigte SDS-Minigele mit Größen von 10 x 12 x 0,4 cm zum Einsatz. Diese wurden auf Grundlage des von Laemmli (1970) entwickelten sowie von See und Jackowski (1989) modifizierten Systems der diskontinuierlichen PAGE hergestellt und durchgeführt. Die genaue Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele sind in Tabelle 18 zu zusammengefasst.

Tab. 18: Komponenten für die Herstellung von zwei SDS-Minigelen

Komponenten für 2 Minigele	Sammelgel	Trenngel	
		10 %	12,5 %
Polyacrylamid-Anteil	3 %	10 %	12,5 %
Rotiphorese®Gel 30 (Acryl-/ Bisacrylamid)	1 ml	4,7 ml	5,8 ml
Sammelgel-/ Trenngelpuffer	2,5 ml	3,5 ml	3,5 ml
TEMED	40 μ l	28 μ l	28 μ l
APS 4 % (w/v)	150 μ l	420 μ l	420 μ l
VE-H ₂ O	6,2 ml	5,3 ml	4,2 ml
SDS 10 % (w/v)	200 μ l	280 μ l	280 μ l

- Laufpuffer: 20 mM Tris, 150 mM Glycin, 0,1 % SDS
- Trenngelpuffer: 500 mM Tris-HCl, pH 6,8
- Sammelgelpuffer: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

Nach Vorbereitung der Gele und dem Befüllen der Kammern mit den spezifischen Laufpuffern, wurden die denaturierten Proteinproben mit MultiFlex Pipettenspitzen der Firma Sorenson BioScience (Salt

Lake City, USA) in die Geltaschen pipettiert. Die zu Beginn angelegte Spannung betrug 80 V und wurde nach ca. 10 min Laufzeit, je nach System auf 100-140 V erhöht. Als Proteinmarker wurde der Precision Plus Protein™ Dual Color Standard der Firma BIO-RAD (München), oder der peqGold™ Protein-Marker IV von Peqlab (Erlangen) verwendet. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Gele für einige Minuten in VE-H₂O gewaschen. Dies ist erforderlich, da SDS den nachfolgenden Färbeprozess stören kann. Nach der Entfernung der entsprechenden Laufpuffer, konnten die Gele gefärbt (Kapitel 8.5.4) oder für Western Blot Analysen (Kapitel 8.6) genutzt werden.

8.5.2 Native PAGE

Das Prinzip der nativen PAGE, auch als alkalische PAGE bekannt, beruht darauf, dass die zu detektierenden Proteine im elektrischen Feld nach ihrer spezifischen Eigenladung bei definiertem alkalischem pH (pH 8,8) aufgetrennt werden. Um den nativen Zustand der Proteine zu erhalten, wird daher bei der Probenvorbereitung auf die Zugabe von SDS und Reduktionsmitteln (z.B. β -Mercaptoethanol) sowie auf Hitzebehandlung verzichtet. Die Durchführung der elektrophoretischen Trennung von rekombinanten PPOs aus *V. vinifera* erfolgte in 10 %igen Polyacrylamid- Minigelen (10 x 12 x 0,4 cm) bei 4°C und einer angelegten Spannung von 80 -90 V. Die Zusammensetzung der Gele ist in Tabelle 19 zusammengefasst. Für die Elektrophorese wurden die Proben vor dem Beladen der Taschen mit 4 x Ladepuffer versetzt.

Tab. 19: Komponenten für die Herstellung von zwei nativen Minigelen

Komponenten für 2 Minigele	Sammelgel	Trenngel
Polyacrylamid-Anteil	3 %	10 %
Rotiphorese®Gel 30 (Acryl-/ Bisacrylamid)	1 ml	4,7 ml
Sammelgel-/ Trenngelpuffer	2,5 ml	3,5 ml
TEMED	40 μ l	28 μ l
APS (Ammoniumperoxodisulfat) 4 % (w/v)	150 μ l	420 μ l
VE-H ₂ O	6,2 ml	5,6 ml

- Laufpuffer: 20 mM Tris, 150 mM Glycin
- Trenngelpuffer: 500 mM Tris-HCl, pH 6,8
- Sammelgelpuffer: 1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
- Ladepuffer (4x konzentriert): 120 mM Tris-HCl, 25 % (v/v) Glycerin, 25 % (w/v) Saccharose, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, pH 6,8

8.5.3 Nachweis der Diphenolase- und Monophenolase-Aktivität

Für den qualitativen Nachweis der Diphenolase- und Monophenolase-Aktivitäten der in dieser Arbeit erzeugten rekombinanten Isoformen L-VvPPOcs-2, L-VvPPOcs-3 sowie der via ortsgerichteter Mutagenese erzeugten Muteine, erfolgte auf Grundlage des Dopachrom-Assays für die Detektion der Diphenolase-Aktivität (Tyrosinase-Aktivität), nach Mason et al. (1948) bzw. des MBTH-Assays für den Nachweis der Monophenolase-Aktivität, nach Pifferi und Baldassari (1973). Letzgenanntes Assay beruht auf der Kupplung (Verhältnis 1:1) von MBTH (3-Methyl-2-benzothiazolinonhydrazonhydrochlorid) mit den enzymatisch gebildeten *o*-Chinonen. Aus dieser hochsensitiven Reaktion geht die Bildung rötlicher Farbkomplexe hervor (MBTH-Chinon-Addukte), welche Absorptionsmaxima im Bereich von 500-505 nm besitzen.

Für die Elektrophorese wurden die 10 %-igen Gele mit jeweils 10 µg der spezifischen rekombinanten PPOs beladen. Die Durchführung erfolgte bei 90 V und 4°C. Anschließend wurden die Gele für 15 min in einem 100 mM Maleat-Tris Puffer pH 5,5 equilibriert. Um die rekombinanten latenten Enzyme zu aktivieren war dieser zusätzlich mit 1,5 mM SDS versetzt. Nachfolgend wurden die Gele für die Aktivitätsfärbung in die jeweiligen Substratlösungen überführt. Diese wurden zuvor auf Basis eines 100 mM Maleat-Tris-Puffers, pH 5,5 erstellt und enthielten ebenfalls 1,5 mM SDS. An Diphenolen kamen für die Detektion der Catecholoxidase-Aktivität 4-Methylcatechol (4-MC), Dopamin (DO) und Kaffeesäure in Konzentrationen von 6 - 10 mM zum Einsatz.

Der Nachweis für die Monophenolase-Aktivität erfolgte mit den Substraten Tyramin (Tyr), *p*-Cumarsäure (*p*-CA) und *p*-Tyrosol. Diese betrug Konzentrationen von jeweils 6 mM. Um die Sensitivität des Assays zu erhöhen, wurden die Substratlösungen zusätzlich mit stöchiometrischen Mengen an MBTH versetzt. Während des Färbeprozesses wurden die Gele in einem Zeitintervall von 5 – 10 min mit Hilfe eines ChemiDoc™ MP System 170-8280 (Bio-RAD, München) Geldokumentationssystems digitalisiert. Die erhaltenen Gelbilder wurden anschließend unter Verwendung des frei erhältlichen Bildbearbeitungsprogramms ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>) densitometrisch ausgewertet. Die hierbei ermittelten integrierten Dichteeinheiten wurden in Abhängigkeit von der Zeit graphisch aufgetragen. Im Anschluss erfolgte eine nichtlinearer Regression an die ermittelten Datenpunkte mittels der Hill-Funktion. Hierbei wurden die jeweiligen Exponenten gleich 1 gesetzt, um einen hyperbolischen Kurvenverlauf zu erhalten.

8.5.4 Coomassie-Färbung

Die Färbung der Polyacrylamidgele erfolgte mit SimplyBlue™ SafeStain der Firma Life Technologies (Darmstadt), oder wurde mit einem Färbeverfahren nach Kang et al. (2002) durchgeführt.

Dazu wurden die Gele nach der Elektrophorese zunächst mit Reinstwasser gewaschen und anschließend mit einer adäquaten Menge der entsprechenden Färbelösung versetzt. Die Inkubation der Gele in der Färbelösung erfolgte unter leichter Bewegung auf einem Schüttler und wurde für ca. 1h bei RT durchgeführt. Um die Hintergrundfärbung gegebenenfalls zu reduzieren wurden die Gele nach Entfernung der Färbelösung erneut mit Reinstwasser für ca. 1 h entfärbt. Dabei wurden die Gele auf einem Schüttler leicht bewegt.

8.6 Western Blot

8.6.1 Transfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen

Um die mittels SDS-PAGE (Kapitel 7.7.1) aufgetrennten Proteine immunologisch detektieren zu können, wurden diese auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Dazu wurde das iBlot™ Gel Transfer System mit den dazugehörigen iBlot® Gel Transfer *Stacks* aus Nitrocellulose (Life Technologies, Darmstadt) verwendet. Die Durchführung erfolgte exakt nach Angaben des Herstellers, dabei wurde eine Transferzeit von 6 min und 20 Volt gewählt.

8.6.2 Antikörper für die Immunodetektion

Die via Western Blot auf Nitrocellulose-Membranen übertragenen Proteine konnten anschließend mit spezifischen Antikörpern immunologisch detektiert werden. Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper waren gegen Hexahistidin-Tags (6xHis-Tags) und Strep-Tag II gerichtet.

8.6.2.1 6xHis-Tag monoklonaler Antikörper

Für den Nachweis der 6xHis-Tag-Fusionsproteine mittels Western Blot, wurde ein 6xHis-Tag *Monoclonal Antibody* der Firma Invitrogen™ (Life Technologies, Darmstadt) verwendet. Dieser wurde in Verdünnungen von 1:1000- 1:2000 eingesetzt. Als Sekundärantikörper diente der alkalische Phosphatase gekoppelte Anti-Maus IgG-Antikörper der Firma Sigma-Aldrich (Hamburg)

8.6.2.2 Strep-Tag® II monoklonaler Antikörper

Zur Detektion der rekombinanten Fusionsproteine mit N-terminalen Strep-Tag® II wurde der spezifische monoklonale Strep-Tag® II Antikörper der Firma Novagen® (Merck Millipore, Darmstadt) verwendet. Dieser wurden mit einer 0,5 %igen Lösung aus Western Blocking Reagent und TBS - Puffer im Verhältnis 1:5000 verdünnt. Als Sekundärantikörper kam ebenfalls der unter 8.6.2.1 genannte alkalische Phosphatase gekoppelte Anti-Maus IgG-Antikörper der Firma Sigma-Aldrich (Hamburg) zur Anwendung.

8.7 Immunodetektion

Um unspezifische Bindungsstellen auf den Nitrocellulose-Membranen nach dem Transfer der Proteine absättigen zu können, wurden diese zunächst für 1 h bei RT in Blockierungslösung inkubiert. Dazu wurde Western Blocking Reagent der Firma Roche (Mannheim) in einer 1 %igen Verdünnung mit TBS - Puffer verwendet. Anschließend wurden die Membranen 3-mal für 5 min mit TBST - Puffer und 2-mal für 5 min mit TBS - Puffer gewaschen. Die Verdünnung der Primärantikörper wurde mit einer 0,5 %igen Lösung aus Western Blocking Reagent und TBS - Puffer erstellt. Dabei wurden unterschiedliche Verdünnungen von 1:1000 bis 1:5000 angesetzt. Die Inkubation der Membranen mit den jeweiligen Primärantikörpern erfolgte entweder für 1 h bei RT, oder über Nacht bei 4°C. Im Anschluss wurden die Membranen erneut 3-mal für 5 min mit TBST - Puffer und 2-mal für 5 min mit TBS - Puffer gewaschen. Für die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden ebenfalls 0,5 %ige Lösungen aus Western Blocking Reagent und TBS - Puffer angesetzt und die Antikörper entsprechend verdünnt. Die Inkubation der Membranen erfolgte für 1 Stunde bei RT unter leichter Bewegung. Im Anschluss wurden die Membranen nochmals 3-mal für 5 min mit TBST und 2-mal für 5 min mit TBS-Puffer gewaschen. Für die alkalische Phosphatase-vermittelte (AP) Farbreaktion wurde die NBT/BCIP Stock Solution der Firma Roche (Mannheim) nach Angaben des Herstellers angesetzt und verwendet. Dazu wurden 200 µl der NBT/BCIP Stammlösung mit 10 ml Reaktionspuffer versetzt und die erhaltene Lösung auf die Membran gegeben. Die Farbreaktion zeigte sich meist unter leichter Bewegung der Membran schon nach 2-5 Minuten und wurde im Anschluss durch intensives Waschen der Membran mit VE-H₂O gestoppt. Danach wurden die Membranen getrocknet und dokumentiert (Kapitel 8.8). Die hier verwendeten Lösungen sind in Tabelle 20 aufgelistet.

Tab. 20: Reagenzien für die AP-vermittelte Farbreaktion

Lösungen	Reaktionspuffer
Western Blocking Reagent (Roche)	Tris-HCl 100 mM pH 9,0
NBT/BCIP Stammlösung (Roche)	NaCl 100 mM
TBS (20 x) Pulver (AppliChem, Darmstadt)	MgCl ₂ 10 mM
TBST Roti® Stammlösung (10 x)	

8.8 Dokumentation der SDS-Gele und Western Blots

Nach der Färbung der SDS-Gele mit Coomassie-Brillantblau (Kapitel 7.7.2) wurden diese mit einem ChemiDoc™ MP System 170-8280 (Bio-RAD, München) dokumentiert und digitalisiert. Die Nitrocellulose-Membranen der Western Blots wurden nach der Immunodetektion (Kapitel 8.7)

zunächst getrocknet und anschließend mit einem Flachbettscanner Perfection 1250 der Firma Epson (Meerbusch) digitalisiert.

8.9 Kinetik-Messungen

Die Kinetik-Messungen zur spezifischen enzymatischen Aktivität von rekombinant erzeugten latenten PPOs aus *V. vinifera* wurden photometrisch in Mikrotiterplatten (96-Well-Platten) durchgeführt und erfolgten in Doppelbestimmung. Als Puffer wurde ein 100 mM Maleat-Tris Puffer pH 4,5 genutzt.

Die entsprechenden Substrate wurden in 8 unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt und die Enzymkonzentration betrug jeweils 1,8 μM . Aktiviert wurden die latenten PPOs mit 1,5 mM SDS.

Die Messungen erfolgten in einem Varioscan Flash Plattenleser (Thermo Scientific, Schwerte) oder einem Tecan Infinite M1000 PRO und wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Änderungen der OD wurden bei der spezifischen Wellenlänge der erwarteten Chinonprodukte photometrisch verfolgt und aufgezeichnet. Die Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der Software *Microsoft Excel*. Hierzu wurden die aufgezeichneten Extinktionen zunächst gegen den Leerwert (*Blank*) korrigiert.

Anschließend konnten die einzelnen Umsatzgeschwindigkeiten (OD/s) für die jeweilig eingesetzte Substratkonzentration anhand der Maximalsteigung innerhalb der ersten Minuten der entsprechenden Kinetik bestimmt werden. Mittels eines von Dr. Uwe Salzbrunn am Institut für Molekulare Biophysik (Mainz) erstellten *Excel-Makros*, wurden Anpassungen über nichtlineare Regression an die ermittelten Umsatzgeschwindigkeiten unter Verwendung der allgemeinen Michaelis-Menten-Gleichung (siehe Gleichung 1) realisiert.

Gleichung 1: Allgemeine Michaelis-Menten-Gleichung.

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

v : Umsatzgeschwindigkeit [OD/s]

v_{max} : Maximalumsatzgeschwindigkeit [OD/s]

K_M : Michaelis-Menten-Konstante [mM]

$[S]$: Substratkonzentration [mM]

Für Kinetiken, bei welchen ein deutlicher Rückgang der Aktivitäten in Abhängigkeit der eingesetzten Substratkonzentrationen beobachtet werden konnte (Produktinhibition), erfolgte eine zusätzliche

Anpassung via nichtlinearer Regression mit Hilfe einer modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung (siehe Gleichung 2). Dies konnte ebenfalls über das oben genannte *Excel-Makro* realisiert werden.

Gleichung 2: Modifizierte Michaelis-Menten-Gleichung für Produktinhibition.

$$v = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_M + [S] + \frac{[S]^2}{K_I}}$$

v : Umsatzgeschwindigkeit [OD/s]

v_{max} : Maximalumsatzgeschwindigkeit [OD/s]

K_M : Michaelis-Menten-Konstante [mM]

K_I : Inhibitionskonstante [mM]

$[S]$: Substratkonzentration [mM]

Zusätzlich wurden über die Regressionen unter Anwendung der Methode der kleinsten Quadrate die enzymatischen Parameter K_M und v_{max} bestimmt. Für den Fall, dass der Extinktionskoeffizient für das entsprechende Chinonprodukt bekannt war, wurde v_{max} über das Lambert-Beer'sche-Gesetz (siehe Gleichung 3) in die Einheit $\mu\text{M/s}$ umgerechnet.

Gleichung 3: Lambert-Beer'sches-Gesetz.

$$E = \varepsilon \cdot c \cdot d$$

E : Extinktion [OD_λ]

c : Konzentration [μM]

d : Schichtdicke [mm]

ε : Extinktionskoeffizient bei spezifischer Wellenlänge (λ) [$\mu\text{M}^{-1} \text{mm}^{-1}$]

8.10 Bestimmung der pH-Optima

Für die Bestimmung der pH-Optima des L-VvPPOcs-2 Wildtyps wurden zwei Messreihen in Abwesenheit und Gegenwart des Aktivators SDS, für einen definierten pH-Bereich von pH 2- pH 9 durchgeführt. Die Messungen erfolgten hierbei an einem Tecan Infinite® M1000 PRO Plattenleser. Die pH-Reihen wurden auf Basis eines 100 mM Citratpuffers (pH 2 – pH 3,5) und einem 100 mM Maleat-

Tris-Puffers (pH 4 – pH 9) erstellt. Für die pH-Reihe mit SDS wurde dieses in einer festen Konzentration von 1,5 mM eingesetzt. Die Konzentration des verwendeten Substrats 4-Methylcatechol betrug jeweils 10 mM. Bei den Messungen wurden die Änderungen der OD bei 405 nm photometrisch in Doppelbestimmung verfolgt und bei Raumtemperatur durchgeführt.

Für die Abschätzung der relativen Aktivitäten wurden zunächst die maximalen Steigungen der ermittelten Messkurven [dOD/s] bestimmt. Mittels dieser konnte anschließend unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes (siehe und Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten des Chinonprodukts ($\varepsilon = 1090 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) die Aktivität berechnet werden (Entstehung des Produktes pro Zeit).

C Ergebnisse

1. Sequenzierung und rekombinante Expression dreier PPO Isoformen von *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon

Als Referenz für die in dieser Arbeit nachfolgend vorgestellten Expressionsstudien spezifischer rekombinanter PPO Isoformen aus der Weinrebe *Vitis vinifera*, diente die von Virador et al. (2010) veröffentlichte Kristallstruktur (PDB-ID: 2P3X) der prozessierten, enzymatisch aktiven Form des Proteins. Im Rahmen dieser Publikation wurden die verwendeten Proteinproben biochemisch aus Trauben eines Grenache Cultivars gewonnen und chromatographisch gereinigt. Die Primärstruktur des vollständigen PPO-Gens, welches nachfolgend als VvPPOg bezeichnet wird, wurde durch cDNA-Klonierung und Sequenzierung erhalten. Diese Sequenz (Zugangsschlüssel für die Nukleotidsequenz: U83274, Zugangsschlüssel für die Polypeptidsequenz: AAB41022) war in der vorliegenden Arbeit die Basis für weitere Datenbankanalysen. Ziel dieser Recherche war es, Nukleotidsequenzen von bestimmten Cultivaren zu identifizieren, welche auf Nukleotidebene möglichst identisch zur Referenzstruktur (VvPPOg) sein sollten. Zudem sollten sie aus Verfügbarkeitsgründen, im Gebiet Rhein-Hessen kultiviert werden. Hierbei konnten durch die Nucleotid BLAST-Funktion des NCBI (National Center for Biotechnology Information) aus der EST-Datenbank (*Expressed Sequence Tags*) Sequenzen aus dem Cultivar Cabernet Sauvignon eruiert werden, welche auf Nukleotidebene hohe Sequenzidentitäten aufwiesen. Mit einem multiplen Sequenzalignment wurden schließlich Primer abgeleitet und generiert, welche für die Herstellung der entsprechenden Expressionskonstrukte benötigt wurden.

1.1 Amplifizierung, Klonierung und Identifizierung der cDNA-Fragmente

Die Primärstruktur der bekannten latenten (L-) L-VvPPOg gliedert sich in vier funktionelle Abschnitte. Beginnend mit einem N-terminalen Transit-Peptid und anschließender N-terminaler Domäne, welche das katalytische Zentrum trägt, folgt ein flexibles Linker-Peptid und eine regulative C-terminale Domäne (siehe Abb. 7). Hierbei umfasst das Transit-Peptid, welches den Transport in die Chloroplasten vermittelt, die Aminosäurepositionen M1 bis G103, während die N-terminale Domäne von Position A104 bis Y433 reicht. Das C-terminale Ende der katalytischen Einheit ist definitionsgemäß nach Marusek et al. (2006) durch das für pflanzliche PPOs charakteristische und hochkonservierte Tyrosin-Motiv (YxY) gekennzeichnet (Abb. 7). Das Linker-Peptid schließt sich in Position K434 an und umspannt den Teilbereich bis zum Anfang der ersten vorhergesagten β -Faltblattstruktur in Position E505 (Marusek et al., 2006). Dieses Glutamat an der initialen Stellung der C-terminalen Domäne, ist in vielen pflanzlichen PPOs konserviert. Die gelöste Kristallstruktur von VvPPOg (PDB-ID: 2P3X) in der

prozessierten und somit enzymatisch aktiven Form, setzt sich aus der N-terminalen Domäne und einem geringen Teil des Linker-Peptids zusammen (Abb. 7). Möglicherweise erfolgt die *in vivo* Aktivierung der latenten Form durch proteolytische Spaltung im Bereich des Linker-Peptids zwischen P442 und K443. Jedoch sind sowohl der genaue Aktivierungsmechanismus, als auch etwaig beteiligte Enzyme bislang unbekannt.

Ausgehend von der beschriebenen VvPPOg Primärstruktur sollten für die Identifizierung spezifischer PPO-Gene aus *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon, im Wesentlichen drei Teilabschnitte amplifiziert und für die spätere Generierung geeigneter Expressionskonstrukte genutzt werden:

1. Der ORF (*open reading frame*) für den kodierenden Bereich der latenten PPO.
2. Der kodierende Bereich für die L-PPO ohne Transit-Peptid.
3. Der kodierende Bereich für die prozessierte enzymatisch aktive Form.

Zu Beginn der Sequenzierungsarbeit konnte Gesamt-RNA aus Blättern und Knospen der Weinrebe isoliert (siehe Kapitel B.5.2) und mittels Einsatz von Oligo-dT-Primern und RT-Reaktion in entsprechende cDNA Fragmente (siehe Kapitel B 5.3) konvertiert werden. Die erhaltene cDNA diente bei den nachfolgend beschriebenen PCR-Reaktionen als Matrize.

Für die Amplifikation wurden vier genspezifische Primer erstellt, welche paarweise in drei Kombinationen eingesetzt wurden. Um das vollständige PPO-Gen vervielfältigen zu können, wurde ein ORF-flankierendes Primerpaar (siehe Anhang G 2.) eingesetzt. Parallel wurden die jeweiligen Primerkombinationen, flankierend für die Teilabschnitte 2 und 3 (siehe Abb. 7) genutzt. Via *Touchdown*-PCR gelang es Amplifikate zu erzeugen, welche mit Längen von 1824 bp, 1512 bp bzw. 1515 bp und 1017 bp den erwarteten Größen entsprachen (Abb. 7). Diese konnten nach elektrophoretischer Separation und Gelextraktion kloniert, die erhaltenen Kolonien visuell selektiert (Blau-Weiß-Selektion) und durch Kolonie-PCR identifiziert werden. Nach Plasmidvermehrung und Isolierung wurden die oben genannten Fragmente mittels vektorspezifischer Primer sequenziert (StarSEQ, Mainz). Die Analyse der erhaltenen Elektropherogramme erfolgte mit dem Programm

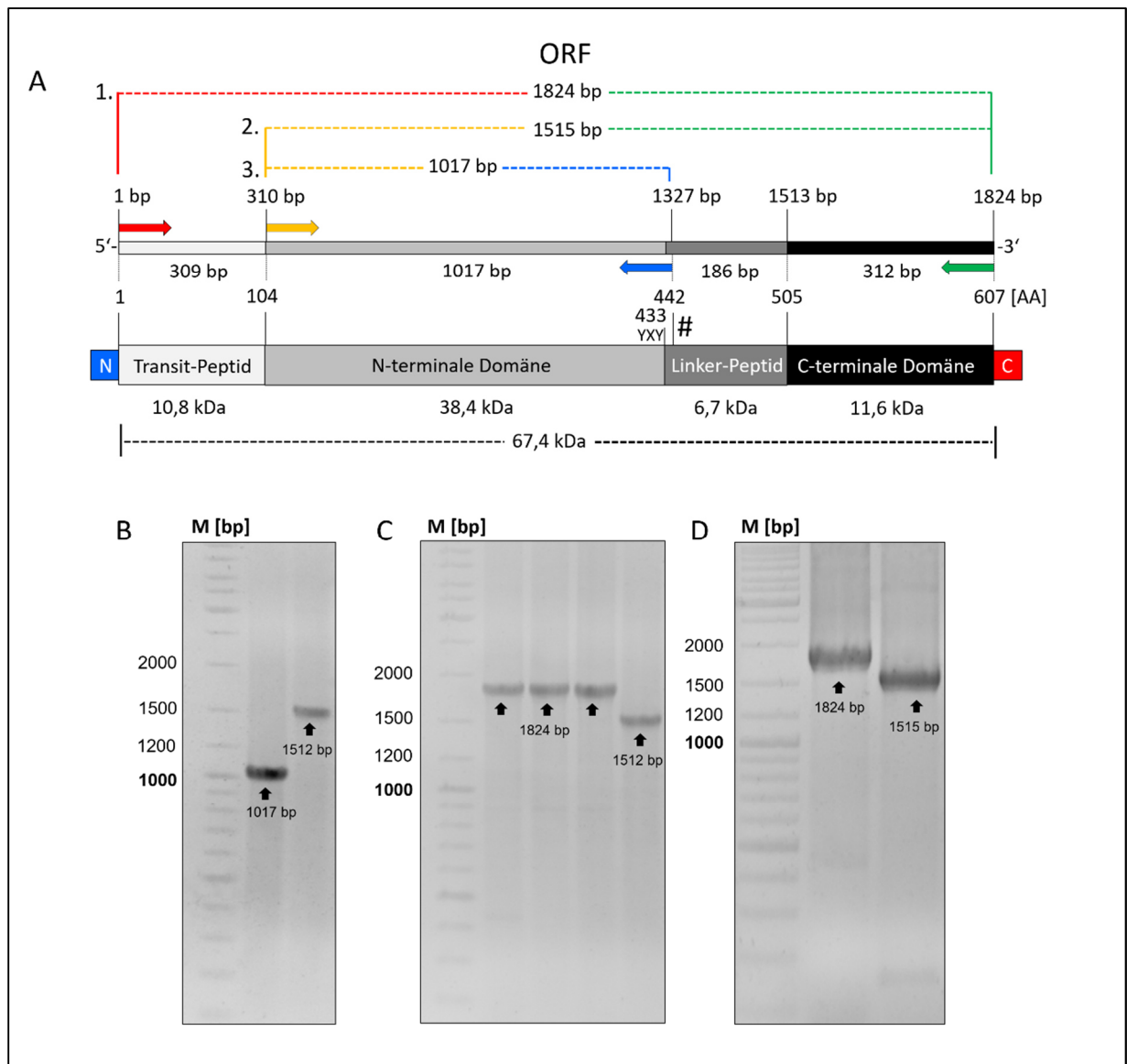


Abb. 7: Schematische Darstellung der cDNA-Struktur des VvPPOg-Gens

(A) Der ORF des VvPPOg Gens mit den jeweiligen Positionen der farbig hinterlegten, genspezifischen Primerpaare (Pfeildarstellung) zur Amplifikation der funktionellen Teilbereiche. Primerpaar 1 (rot, grün) flankiert den gesamten ORF und somit alle vier Teilbereiche (angegeben mit den jeweiligen theoretischen Massen in kDa). Primerpaar 2 (gelb, grün) umfasst den kodierenden Bereich für die latente PPO (L-PPO) ohne Transit-Peptid. Die Primerkombination 3 (gelb, blau) entspricht den Genflanken des zu amplifizierenden, kodierenden Bereichs für die prozessierte und enzymatisch aktive Form. Dieser Teilbereich ohne Transit-Peptid besteht aus der N-terminalen Domäne und den ersten 9 Aminosäuren des Linker-Peptids. Das C-terminale Ende der N-terminalen Domäne ist durch das hochkonservierte Tyrosin-Motiv (YxY) charakterisiert. Die potentielle Protease-Schnittstelle an K443 im Bereich des Linker-Peptids, ist mit dem Symbol # gekennzeichnet.

Die Teilbilder (B), (C) und (D) zeigen gelelektrophoretisch separierte DNA-Fragmente der PCR-Produkte in erwarteter Größe, welche ausgehend von cDNA aus dem Cultivar Cabernet Sauvignon unter Verwendung der o.g. Primerkombinationen generiert wurden. Anschließend erfolgte die Extraktion und Klonierung der DNA-Fragmente. Gele: Agarose 1%; TBE, [Verwendeter Marker: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte)]

FINCHTV. Nach Detektion und Entfernung der vorhandenen Vektorflanken wurden redundant erhaltene Sequenzfragmente unter Berücksichtigung eines ausreichenden Überlappungsbereichs (ca.

Abb. 8: Sequenzalignment von den Primärstrukturen der sequenzierten latenten PPO Isoformen und der Referenzstruktur (L-VvPPOg). Die schwarz hinterlegten Aminosäurepositionen entsprechen den zu 100 % konservierten Bereichen. Zudem sind die Positionen mit 75 % (weiß auf grauem Grund) und 50 % Konservierung (schwarz auf grauem Grund) markiert. Oberhalb der präsentierten Aminosäurepositionen sind die entsprechenden Sekundärstrukturelemente (α = α -Helix; β = β -Faltblatt) gezeigt, welche aus der bekannten Kristallstruktur von VvPPOg (PDB-ID: 2P3X) für den Bereich der prozessierten Proteine übernommen wurden. Dieser Bereich setzt sich primär aus N-terminaler Domäne (schwarzgestrichelte Darstellung unterhalb der Teilbereiche des Alignments) zusammen, deren C-terminales Ende durch das konservierte Tyrosin-Motiv (YxY) gekennzeichnet ist. Dieses reicht bis zur Position P339 des Linker-Peptids (hellblau). Die C-terminale Domäne (violett) schließt sich in Position Q402 an. Im Bereich der N-terminalen Domäne befindet sich das binukleäre Kupferzentrum bestehend aus CuA (grün) und CuB (rot). Die hier lokalisierten und für die enzymatische Funktionalität essentiellen Cu-koordinierenden Histidine [CuA (H_{A1}, H_{A2}, H_{A3}), CuB (H_{B1}, H_{B2}, H_{B3})] sind in allen drei Isoformen vorhanden. Am CuB-Motiv befindet sich ein Phenylalanin (F259 bzw. F260, cyan), welches für alle drei Isoformen konserviert ist. Des Weiteren finden sich vier konservierte Cysteine (C11, C25, C26, C88), welche untereinander zwei Disulfidbrücken (gelb) bilden [C11-C26, C25-C88 (-S-S-)]. Die Präsenz eines weiteren strikt konservierten Cysteins (C91), welches sich auf Position H_{A1} am CuA-Motiv befindet, ist ein weiteres markantes Merkmal für pflanzliche PPOs. Dieses geht in allen bisher kristallisierten pflanzlichen PPOs (*V. vinifera*, 2P3X; *J. regia* 4CE9; *I. batatas*, 1BT3) eine Thioetherbrücke mit einem Kohlenstoffatom des Imidazolrings von H_{A2} [C91-H108 (-S-C-)] ein.

Verwendete Programme: ClustalW, grafische Darstellung und Bearbeitung Gendoc (Nicholas et al., 1997).

50-100 bp) assembliert und gemäß des universellen genetischen Codes in die jeweiligen Aminosäuresequenzen übersetzt. Anschließend wurden diese mit der Primärstruktur von VvPPOg verglichen (s. Kapitel 1.2).

Im Vergleich zu L-VvPPOg ergaben sich für die 1824 bp großen Fragmente auf Nukleotidebene Sequenzidentitäten von 99,5 %. Aufgrund der Abweichung von 0,5 % ist es nicht auszuschließen, dass es sich bei diesem sequenzierten Genprodukt, um ein Allel bzw. für Cabernet Sauvignon spezifischen Polymorphismus handelt und wird fortan als VvPPOcs-1 angesprochen.

Tab.21: Identitätsmatrix der Nukleotidsequenzen der L-VvPPOcs Isoformen und VvPPOg. Das zugrunde liegende Alignment wurde ohne kodierenden Bereich für das Transit-Peptid erstellt.

	L-VvPPOcs-1	L-VvPPOcs-2	L-VvPPOcs-3	L-VvPPOg
L-VvPPOcs-1	100 %			
L-VvPPOcs-2	95,4 %	100 %		
L-VvPPOcs-3	80,9 %	81,9 %	100 %	
L-VvPPOg	98,8 %	95,8 %	81,3 %	100 %

Durch Sequenzierung der 1512 bp und 1515 bp *Inserts* (Abb. 7) konnten zwei weitere Isoformen gefunden werden, welche als L-VvPPOcs-2 und L-VvPPOcs-3 bezeichnet wurden. Während L-VvPPOcs-2 eine Sequenzidentität von 95,8 % zu L-VvPPOg besitzt, zeigt L-VvPPOcs-3 mit 81,3 % Identität die größte Abweichung (siehe Tab. 21). Des Weiteren besitzt die letztgenannte Form eine Insertion von drei Nukleotiden im kodierenden Bereich der N-terminalen Domäne.

1.2 Sequenzanalyse von L-VvPPOcs-1, L-VvPPOcs-2 und L-VvPPOcs-3

Um die Primärstrukturen der drei sequenzierten Isoformen (L-VvPPOcs-1, L-VvPPOcs-2 und L-VvPPOcs-3) vergleichen zu können, wurden diese mit der Aminosäuresequenz von L-VvPPOg unter Anwendung des Programms ClustalW aliniert (siehe Abb. 8). Da VvPPOcs-2 und L-VvPPOcs-3 jeweils ohne Transit-Peptid sequenziert worden sind, konnte dieser Teilabschnitt bei der Anfertigung des Alignments nicht

berücksichtigt werden. Aus einer Identitätsmatrix (siehe Tab. 22), welche zusätzlich generiert wurde, resultierten bei Abgleich mit L-VvPPOg für die L-VvPPOcs-1 und L-VvPPOcs-2 Varianten, Identitäten von 98,8 % bzw. 95,8 %. (siehe Tab.23).

Tab.22: Genabschnitte für die prozessierten und latenten Isoformen (L-PPO). Angegeben sind die jeweiligen Fragmentlängen in Basenpaaren (bp) mit den entsprechenden Längen der Polypeptidketten (aa). Zusätzlich sind die zugehörigen, theoretischen Massen in kDa angegeben (s. eckige Klammern).

	L-VvPPOcs-1	L-VvPPOcs-2	L-VvPPOcs-3	L-VvPPOg
L-VvPPOcs-1	100 %			
L-VvPPOcs-2	95,4 %	100 %		
L-VvPPOcs-3	80,9 %	81,9 %	100 %	
L-VvPPOg	98,8 %	95,8 %	81,3 %	100 %

Tab. 23: Identitätsmatrix der Aminosäuresequenzen der L-VvPPOcs Isoformen und VvPPOg

	Gen ohne Transitpeptid	Genprodukt ohne Transit-Peptid	Genabschnitt der N-terminalen Domäne	Genprodukt der N-terminalen Domäne
L-VvPPOcs-1	1512 bp	504 aa [56,8 kDa]	1017 bp	339 aa [38,5 kDa]
L-VvPPOcs-2	1512 bp	504 aa [56,7 kDa]	1017 bp	339 aa [38,5 kDa]
L-VvPPOcs-3	1515 bp	505 aa [56,6 kDa]	1020 bp	340 aa [38,6 kDa]
L-VvPPOg	1512 bp	504 aa [56,7 kDa]	1017 bp	339 aa [38,4 kDa]

Wie bereits unter 1.1 angesprochen ist für L-VvPPOcs-3 eine Insertion von einer Aminosäure (P130) im Bereich der N-terminalen Domäne charakteristisch. Diese hat somit eine Kettenlänge von 505 Aminosäuren (ohne Transit-Peptid) und zeigt mit rund 81,3 % Sequenzidentität auch auf Aminosäureebene die höchste Abweichung zur Referenzstruktur (L-VvPPOg, siehe Tab. 23). Beim Vergleich der im Alignment repräsentierten funktionellen Teilabschnitte (Abb. 8) der Isoformen, zeigt sich die größte Heterogenität im Bereich der katalytischen N-terminalen Domäne von L-VvPPOcs-3. Während das CuA-Motiv weitgehend konserviert ist, befinden sich, flankierend zu H_{B1} und H_{B2} im Bereich des CuB-Motivs, teilweise erhebliche Unterschiede (Abb. 8).

1.3 Rekombinante Expression von VvPPOcs-1 und VvPPOcs-2 in *E. coli*

1.3.1 Rekombinante Expression der N-terminalen Domäne von VvPPOcs-1 mit N-terminalem His-Tag

Für die heterologe rekombinante Expression der N-terminalen Domäne von VvPPOcs-1 in *E.coli*, wurden zwei Genfragmente genutzt. Zum einen wurde der 1020 bp umfassende kodierende Bereich gewählt, welcher der prozessierten, katalytischen Einheit entspricht und sich aus N-terminaler

Domäne sowie den ersten 9 Aminosäuren (Q434 - P442) des Linker-Peptids zusammensetzt. Als zweite Konstruktvariante wurde der Teilbereich genutzt, welcher mit 1206 bp ebenfalls die N-terminale Domäne kodiert, jedoch zusätzlich die vollständige Sequenz des Linker-Peptids beinhaltet (Q434-E504, siehe Abb. 9).

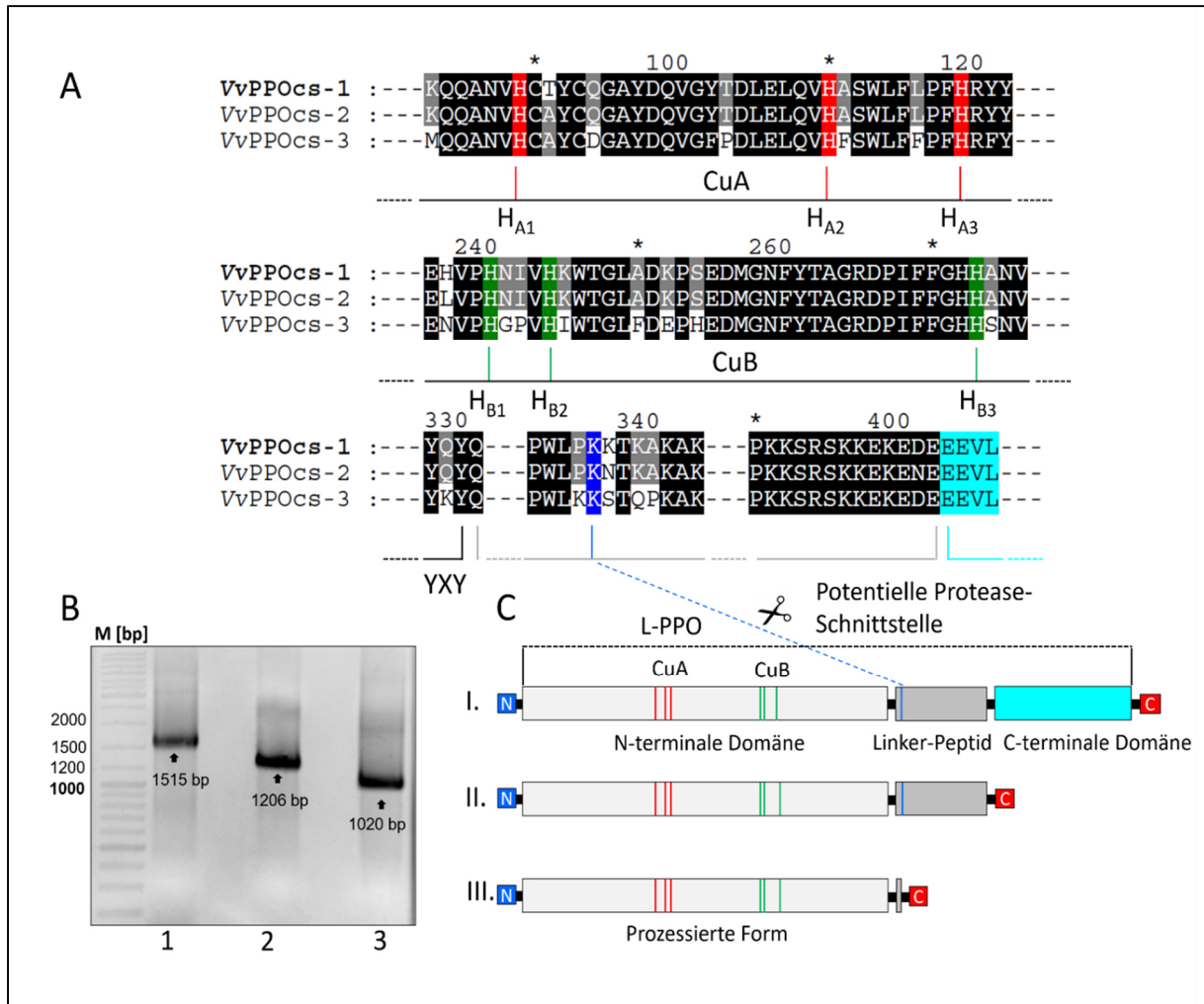


Abb. 9: Überblick über die generierten Amplifikate für die Herstellung der Expressionskonstrukte.

(A) Ausschnitt eine multiplen Alignments der drei sequenzierten Isoformen. Das binukleäre Kupferzentrum mit den koordinierenden Histidinen. Unterhalb sind zusätzlich die entsprechenden Aminosäurepositionen für die drei Isoformen aus Cabernet Sauvignon in einem Teilalignment dargestellt. (B) 1 %iges Agarosegels der getrennten Amplifikate, welche für die Generierung der Expressionskonstrukte bestimmt waren. Spur 1 zeigt den ORF des L-VvPPOcs-1 Gens für die latente Form [(C) Teilstruktur I]. Spur 2 (Teilstruktur II) und 3 (Teilstruktur III) zeigen die Amplifikate in einem 1 %igen Agarosegel, welche extrahiert und anschließend in den pTrc-His Vektor kloniert wurden. [Verwendeter Marker: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte)]

Die Herstellung der Expressionskonstrukte erfolgte durch Ligation der genannten Fragmente (jeweils mit zusätzlichem Terminationscodon) in einen pTrcHis-TOPO® TA Vektor (Invitrogen, Life Technologies, Darmstadt). Dieser Expressionsvektor, kodiert stromaufwärts von der Multiklonierungsstelle MCS (engl. *multiple cloning site*) für einen 6xHis-Affinitätstag. Nach Expression des Fusionsproteins, ist dieser entsprechend N-terminal lokalisiert. Mit Hilfe des Affinitäts-Tags konnte die spätere Aufreinigung der rekombinanten Proteine via Affinitätschromatographie (IMAC) realisiert werden

(siehe Kapitel B. 8.6.2.1). Alle erzeugten Expressionskonstrukte wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft (StarSEQ, Mainz). Nach erfolgreicher Transformation in BL21 *Competent Cells* (Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt) erfolgte die Kultivierung bei 37°C unter Verwendung eines LB-Mediums, welches mit 25 µM CuCl₂ und 50 - 100 µg/ml Carbenicillin supplementiert wurde. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,6 wurde die Expression mit 0,1 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) induziert. Um das Expressionsprofil des pTrcHis-VvPPOcs-1-Konstrukts über einen definierten Zeitraum von 24 Stunden evaluieren zu können, wurden sogenannte Pilotexpressionen durchgeführt (siehe Kapitel B 7.1.1). Die Analysen erfolgten mit Hilfe von SDS-PAGE und Western-Blot (siehe Kapitel B 8.5.1 und B 8.6).

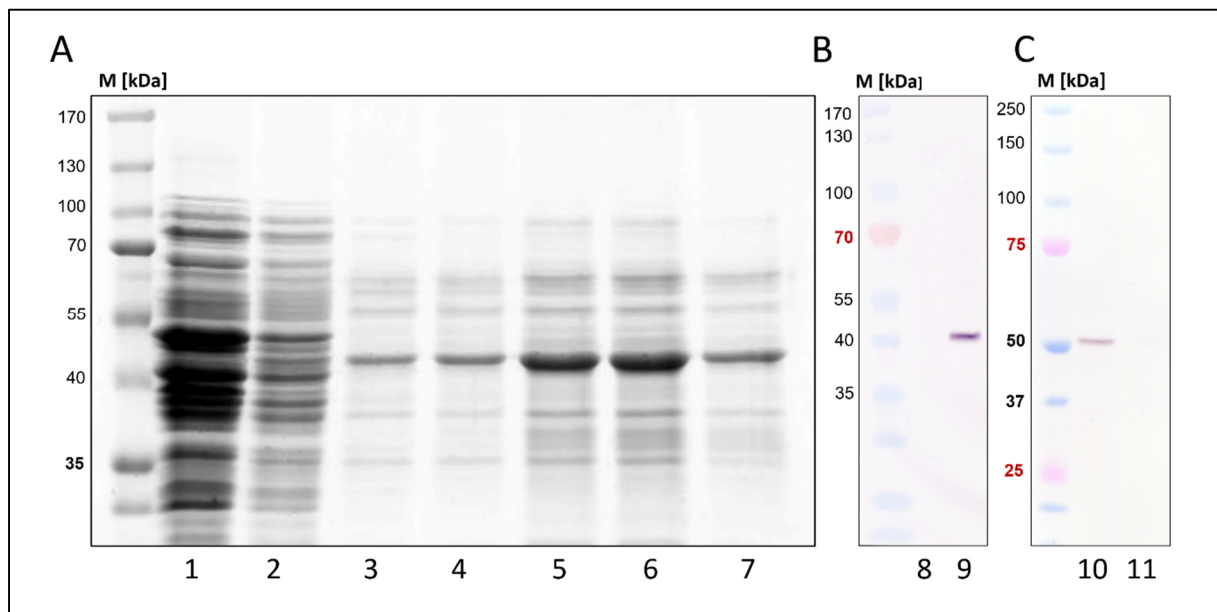


Abb. 10: Nachweis der rekombinant erzeugten VvPPOcs-1-Varianten mittels SDS-PAGE und Western-Blot. (A) 4-12 %iges Polyacrylamidgel, Färbung Coomassie-Brillant-Blau. Die aufgetragenen Proteinproben (1-7) wurden mit Hilfe von IMAC erhalten. Spur 1 zeigt das geklärte Lysat vor Säulendurchlauf. In Spur 2 wurde die Waschfraktion (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 30 - 50 mM Imidazol) aufgetragen. Die Spuren 3-7 repräsentieren die Proteinfractionen, welche nach Elution mit der entsprechenden Pufferlösung (50 mM NaH₂PO₄ pH 8,0, 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol) erhalten wurden. Neben den rekombinanten Proteinen, welche bei einer erwarteten Masse von ca. 42 kDa migrieren, sind noch Spuren von hoch- und niedermolekularen, bakteriellen Begleitproteinen zu erkennen. (B) Western-Blot mit nicht-induziertem Lysat (Spur 8) als Negativkontrolle. Auf Spur 9 ist die eluierte Proteinprobe (siehe auch Spur 5, Teilbild A) mit einer distinkten Bande bei ca. 42 kDa zu sehen. Diese stimmt ebenfalls mit der theoretischen Masse überein. (C) Western-Blot für die Determinierung der Löslichkeit des Expressionsprodukts (Variante 2: Konstrukt mit 1206 bp *Insert*) nach durchgeführter Pilotexpression. Hier wurden jeweils Pellet (unlösliche Fraktion, Spur 10) und Überstand (lösliche Fraktion, Spur 11) nach 6 h Expression bei 37°C aufgetragen. Die Fusionsproteine mit erwarteter Masse von rund 54 kDa, konnten lediglich in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden. [Verwendete Marker: Teilbild (A) und (B) peqGold™ Protein-Marker IV (Peqlab, Erlangen); Teilbild (C) PrecisionPlus™ Prestained Dual Color (BIO-RAD, München) Primärantikörper: 6xHis Tag, monoklonal; Sekundärantikörper: Anti-Maus IgG (AP-Konjugat), Färbung: Coomassie-Brillant-Blau nach Kang et al. (2002)]

Die Pilotexpression wurde als 100 ml Expressionsansatz (100 ml LB-Medium, 50-100 µg Carbenicillin, 25 µM CuCl₂) durchgeführt und die Zellsuspensionen in 2 ml Einheiten fraktioniert. Für das Sammeln der Proben wurde nach Entnahme von Stunde 0 (nicht-induziert) über die ersten 7 Stunden nach Induktion, ein Zeitintervall von einer Stunde gewählt. Die letzten Fraktionen wurden nach 20 und 24

Stunden entnommen. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und die erhaltenen Pellets über Nacht bei -20°C eingefroren. Hierauf erfolgte die Resuspension der Pellets in $50\ \mu\text{l}$ Lysepuffer ($50\ \text{mM NaH}_2\text{PO}_4$ pH 8,0, $300\ \text{mM NaCl}$, $20\ \text{mM Imidazol}$ pH 8,0) und Sonifikation auf Eis. Nach erneuter Zentrifugation konnten die Lysat-Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert werden. Hierzu wurden die jeweiligen Proben, bestehend aus den Überständen (lösliche Fraktionen) und Pellets (unlösliche Fraktionen) mit Laemmli-Probenpuffer versetzt, hitzedenaturiert und zu identischen Volumenanteilen auf 4-12 %ige SDS-Polyacrylamid-Gradientengele aufgetragen. Nach gelelektrophoretischer Separation und Coomassie-Brillantblau-Färbung konnten die rekombinanten Proteine, sowohl in der löslichen, als auch in der unlöslichen Fraktion anhand distinkter Banden auf Höhe der erwarteten theoretischen Masse von ca. 42,3 kDa detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

Ferner zeigten die löslichen Fraktionen, nach 6 h Inkubation die höchste Intensität für die Proteinfraction auf Höhe von ca. 42 kDa. Ab Stunde 20 waren die potentiellen rekombinanten Proteine in der löslichen Fraktion nicht mehr nachweisbar. Unter Verwendung eines monoklonalen 6xHis-Tag Primärantikörpers (Invitrogen™, Life Technologies, Darmstadt) sowie eines AP (Alkalische Phosphatase) gekoppelten Anti-Maus IgG Sekundärantikörpers, konnten die rekombinanten Proteine über Western-Blot als 6xHis-Fusionsproteine identifiziert werden. Ausgehend von dem auf diese Weise ermittelten Expressionsprofil, erfolgten alle weiteren Expressionsversuche des pTrcHis-VvPPOcs-1-Konstrukts bei 37°C über einen Zeitraum von 6 h. Anschließend wurden die Zellen pelletiert und mittels Sonifikation lysiert. Aus den erhaltenen Proteinextrakten (geklärte Lysate) wurden die rekombinanten 6xHis-Fusionsproteine mittels Nickel-Affinitätschromatographie unter Verwendung einer Nickel-Nitriloessigsäure-Matrix (Ni-NTA-Agarose) immobilisiert und anschließend eluiert (siehe Abb. 10)

Für das zweite Expressionskonstrukt des pTrcHis-VvPPOcs-1-Konstrukts mit dem beschriebenen 1206 bp *Inserts* wurde ebenfalls eine Pilotexpression, wie oben beschrieben, durchgeführt. Jedoch konnten die entsprechenden Expressionsprodukte ausschließlich in der unlöslichen Fraktion nachgewiesen werden. Da die Proteine für enzymatische Tests sowie Kristallisationsversuche bestimmt waren und hierfür nativ vorliegen sollten, wurde auf eine nachfolgende denaturierende Aufreinigung verzichtet.

1.3.2 Rekombinante Expression der N-terminalen Domäne von VvPPOcs-1

Um die Aufreinigung der rekombinant erzeugten N-terminalen Domäne von VvPPOcs-1 zu optimieren, wurde ein zweites Konstrukt für einen N-terminal kodierenden Strep-Tag II (WSHPQFEK) erstellt. Hierzu wurde die korrespondierende Sequenz für den Affinitätstag, zusammen mit einer zusätzlichen 3'-terminal lokalisierten Enterokinase-Schnittstelle (EK, DDDDK) mittels PCR (siehe Anhang D 2.) an das 5'-Ende des 1020 bp Fragments (siehe Abb. 11) fusioniert. Die EK-Schnittstelle ermöglicht die limitierte Proteolyse des Tags durch Enterokinase, wodurch potentielle, Tag-induzierte Störeffekte in den nachfolgenden Zielexperimenten, wirksam vermieden werden können.

Die generierten PCR-Produkte wurden anschließend in einen pTrc-His2-TOPO® TA Vektor kloniert und nach Verifizierung in den Expressionsstamm [BL21 Competent Cells, Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt] eingebracht. Die Pilotexpression erfolgte unter den in 1.3.1 beschriebenen Bedingungen. Auch hier konnte das gewünschte Strep-Tag II-Fusionsprotein sowohl in der löslichen, als auch in der unlöslichen Fraktion mittels Western-Blot nachgewiesen werden. Nach Expression eines 500 ml Ansatzes erfolgte die Aufreinigung des rekombinanten VvPPOcs-1 mit Hilfe von Strep-Tactin® Matrix (Novagen®, Merck, Darmstadt). Die eluierten Fraktionen wurden anschließend zusammen mit dem Rohextrakt (geklärtes Lysat) mittels SDS-PAGE und Western-Blot [(Primärantikörper: Strep-Tag® II *Monoclonal Antibody* (Novagen®, Merck Millipore))] analysiert. Hierbei zeigten die rekombinant erzeugten Strep-Tag II-Fusionsproteine ein erwartetes Laufverhalten, mit einer prominenten Bande bei ca. 44 kDa (Abb. 11). Die erhaltenen Eluate wurden kurz nach der Aufreinigung einem

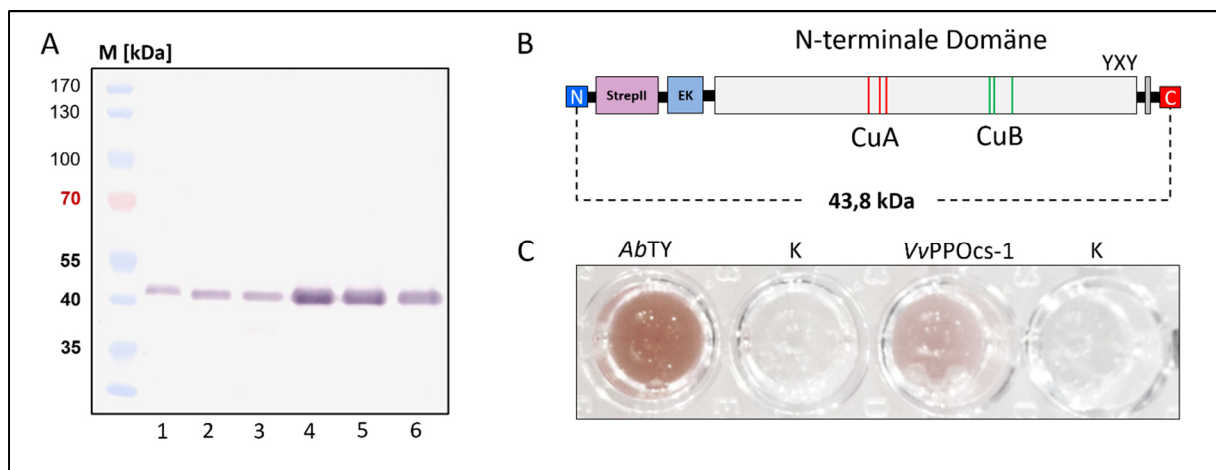


Abb. 11: Nachweis der StrepII-Fusionsproteine nach affinitätschromatographischer Reinigung. A) Western-Blot für die Detektion der Fusionsproteine nach affinitätschromatographischer Reinigung. Spur 1 zeigt das geklärte Lysat vor dem Säulendurchlauf. Spuren 2-6 repräsentieren die einzelnen gesammelten Eluatfraktionen. Für alle aufgetragenen Proben konnten die rekombinanten Proteine, durch scharf definierte Banden auf Höhe von ca. 44 kDa, eindeutig als StrepII-Fusionsproteine identifiziert werden [Primärantikörper: Strep-Tag® II *Monoclonal Antibody* (Novagen®, Merck Millipore, Sekundärantikörper: Anti-Maus IgG (AP-Konjugat); Marker: peqGold™ Protein-Marker IV (Peqlab, Erlangen)]. (B) Schematische Darstellung des Expressionskonstrukts für die rekombinante Expression in *E. coli*. Das Expressionsprodukt setzt sich aus den beiden N-terminal fusionierten Bereichen des Strep-Tag II (WSHPQFEK, violett) und einer zusätzlichen EK-Schnittstelle (DDDDK, hellblau), sowie der katalytischen N-terminalen Domäne (hellgrau) und der 9 initialen Aminosäuren des Linker-Peptids (dunkelgrau) zusammen. Es besitzt eine theoretische Gesamtmasse von 43,8 kDa (A). (C) Aktivitätsschnelltest in einer Mikrotiterplatte, zur visuellen Überprüfung der katalytischen Aktivität. Hier kamen jeweils 10 mM des Substrats Dopamin zum Einsatz. An rekombinantem Protein [s. Spur 4, (A)] wurden 10 µl (die genaue Proteinkonzentration wurde für diesen Versuch nicht bestimmt) eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten 10 µg *A. bisporus* Tyrosinase (*AbTyr*, Sigma-Aldrich) und als Negativkontrolle jeweils Elutionspuffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0; 150 mM NaCl; 2,5 mM Desthiobiotin; 1 mM EDTA) versetzt mit 10 mM Dopamin (K). Für *AbTyr* ergab sich unmittelbar nach Zugabe des Substrats, eine deutliche Farbreaktion, während das rekombinante VvPPOcs-1 auch nach längerer Zeit nur eine äußerst geringe Aktivität zeigte. [Verwendeter Marker: peqGold™ Protein-Marker IV (Peqlab, Erlangen)]

enzymatischen Schnelltest unterzogen. Zu diesem Zweck wurden 10 µl der Eluatfraktion mit Dopamin (Endkonzentration 10 mM) versetzt und bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurde *AbTY* (*Agaricus bisporus* Tyrosinase, 10 µg, Sigma-Aldrich) als Positivkontrolle eingesetzt. Nach etwa einer Minute ergab sich für die eingesetzte *AbTY* eine typische Farbreaktion (rotbraun), welche auf die Bildung des Oxidationsprodukts Aminochrom und aus diesem autokatalytisch gebildeten Melanin

zurückzuführen ist. Die rekombinanten Proteinproben zeigten hingegen nur eine äußerst geringe Färbung, was vermutlich auch auf Autooxidation des eingesetzten Substrats zurückzuführen war. Von einer weiteren Optimierung zur Aufreinigung des rekombinanten VvPPO-1 wurde abgesehen, nachdem keine nennenswerte Katalyse festgestellt wurde.

1.3.3 Rekombinante Expression des latenten L-VvPPOcs-2 und L-VvPPOcs-3 mit N-terminalem Strep-Tag II

Um die beiden Isoformen L-VvPPOcs-2 und L-VvPPOcs-3 in latenter Form exprimieren zu können, wurden die jeweiligen 1512 bp und 1515 bp Fragmente (siehe 1.1, Abb. 8), welche zuvor in einen pGEM[®]-T Vektor ligiert wurden, anschließend mittels gerichteter Klonierung unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Not*I in einen pET-51b(+) Vektor ligiert. Bei diesem wird die Expressionskontrolle über einen T7-Promotor gesteuert. Zudem kodiert der Vektor stromaufwärts der Multiklonierungsstelle ebenfalls für eine EK-Schnittstelle und einen Strep-Tag II in gleicher Anordnung, wie bereits für das PCR-Fusionsprodukt in Abschnitt 1.3.2 beschrieben. Nach Überprüfung der Plasmide mittels Sequenzierung (StarSEQ, Mainz) wurden die Konstrukte für die Expression in Rosetta[™] 2(DE3) pLysS (Novagen[®], Merck-Millipore, Darmstadt) Zellen eingebracht. Die Expression des L-VvPPOcs-2-Konstrukts wurde zunächst mittels Autoinduktion unter Einsatz eines ZYM-5052 Mediums nach Studier et al. (2005) durchgeführt und konnte in *Overnight Express[™] Instant* LB Medium (Novagen[®], Merck, Darmstadt) optimiert werden. Letztgenanntes wurde nachfolgend bei allen weiteren Expressionen verwendet. Die Medien wurden nach Dirks-Hofmeister et al. (2013), jeweils mit 250-300 μ M CuCl₂ angereichert und mit den geeigneten Antibiotika (100 μ /ml Carbenicillin, 35 μ g/ml Chloramphenicol) versetzt. Die Expression erfolgte unter mäßiger Belüftung in 1 l Ansätzen. Diese wurden bei 23-26°C für 48 h schüttelnd inkubiert. Nach anschließender Affinitätschromatographie mit Hilfe von Strep-Tactin[®] Matrix (Novagen[®], Merck, Darmstadt) wurden die erhaltenen Eluate mittels Ultrafiltration (Amicon Ultra-15) mit einer nominalen Molekulargewichtsgrenze von 30 kDa angereichert. Die Bestimmung des Proteingehalts der Eluatkonzentrate erfolgte spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm und wurde mittels Lambert-Beers'schen Gesetz berechnet. Hierfür wurden die spezifischen molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ_{280}), welche über den Onlinedienst ProtParam (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>) ermittelt wurden für die jeweiligen Isoformen berücksichtigt. Für die Expression von L-VvPPOcs-2 ergaben sich Ausbeuten von ca. 6-8 μ g/ml Rohextrakt, während die Expression des L-VvPPOcs-3-Konstrukts deutlich schwächer ausfiel. Daher wurden die Expressionsansätze für L-VvPPOcs-3 auf 2 l erhöht.

Durch SDS-PAGE konnte gezeigt werden, dass die rekombinanten Proteine nativ in hoher Reinheit gewonnen werden konnten (ca. 95 %, siehe Abb.12).

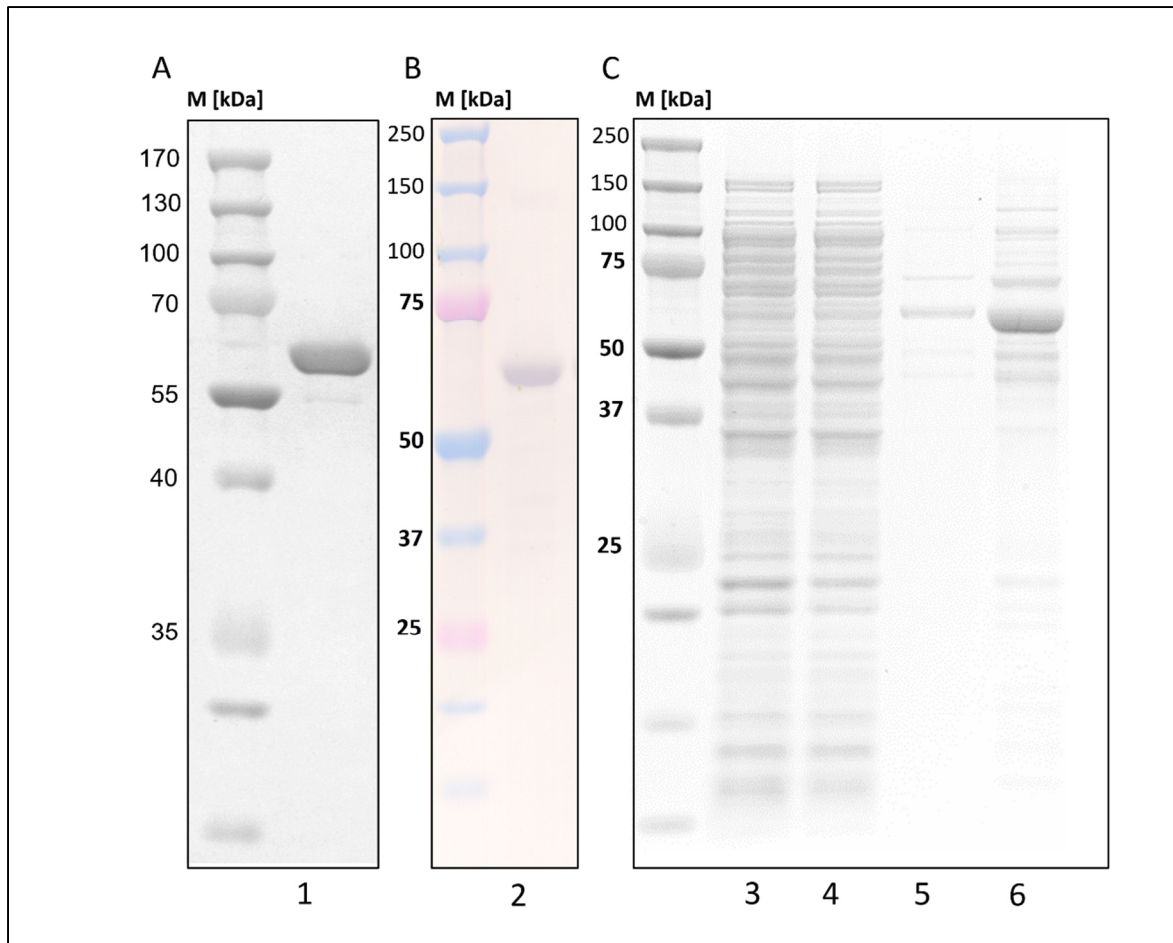


Abb. 12: Nachweis der rekombinanten L-VvPPOcs-2 und L-VvPPOcs-3 Expressionsprodukte nach affinitätschromatographischer Reinigung mittels Strep-Tactin® Matrix. (A) 4-12 %ige SDS-PAGE des aufgereinigten L-VvPPOcs-2-Konzentrats (Spur 1). Wie deutlich zu erkennen ist, erscheinen die exprimierten rekombinanten Proteine als solitäre Bande auf Höhe der theoretischen Masse von ca. 60 kDa. (B) Western-Blot-Analyse des unter (A) gezeigten Konzentrats. Mittels eines Anti-StrepII-Primärantikörpers konnten die rekombinanten Proteine eindeutig als Strep-Tag® II -Fusionsproteine identifiziert werden. (C) 4-12 %ige SDS-PAGE des L-VvPPOcs-3 Expressionsprodukts. Spur 3 zeigt das Rohextrakt und Spur 4 das Lysat nach Säulendurchlauf. Spur 5 repräsentiert die vereinigten Eluatfraktionen. Hier ist das rekombinante L-VvPPOcs-3 als schwache Bande bei ca. 60 kDa zu erkennen. Deutlicher war das rekombinante L-VvPPOcs-3, im Konzentrat auf Spur 6 zu detektieren. [Verwendeter Marker: PrecisionPlus™ Prestained Dual Color (BIO-RAD, München), Färbung: Coomassie-Brillant-Blau nach Kang]

1.3.4 Detektion der enzymatischen Aktivität von L-VvPPO-2 und L-VvPPOcs-3

Die enzymatische Aktivität des rekombinanten L-VvPPOcs-2 wurde mit Hilfe eines biochemischen Assays und nativer PAGE qualitativ verfolgt. Als Modell-Substrate für die visuelle Detektion der Diphenolase-Aktivität wurden jeweils 10 mM 4-Methylcatechol (4-MC), Dopamin (DA) und Kaffeesäure eingesetzt. An Monophenolen kamen ebenfalls jeweils 10 mM Tyramin (Tyr) und *p*-Cumarsäure (*p*-CA) zum Einsatz. Um die Sensitivität des Assays zu erhöhen, wurden die Substrate zusätzlich mit stöchiometrischen Mengen MBTH (3-Methyl-2-benzothiazolinonhydrazonhydrochlorid) versetzt. Die elektrophoretische Trennung erfolgte in nativen Polyacrylamidgelen (10 %). An rekombinantem Protein wurden jeweils 10 µg aufgetragen. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei 90 V und 4°C. Anschließend wurden die Gele für 15 min mit Waschpuffer (Maleat-Tris 100 mM, pH 5,5)

equilibriert, welcher zusätzlich den Aktivator SDS (Natriumdodecylsulfat, 1,5 mM) enthält. Da die Geschwindigkeiten der auftretenden Farbreaktionen sowie die beobachteten Intensitäten, substratspezifisch sehr unterschiedlich ausfielen, wurden die Gele je nach Substrat für 5 min (4-MC) bis maximal 1 h (Tyr) in den entsprechenden Substratlösungen bei Raumtemperatur inkubiert. Als Positivkontrolle wurde jeweils 5 μ g *Agaricus bisporus* Tyrosinase (*AbTY*) eingesetzt (siehe Abb. 13).

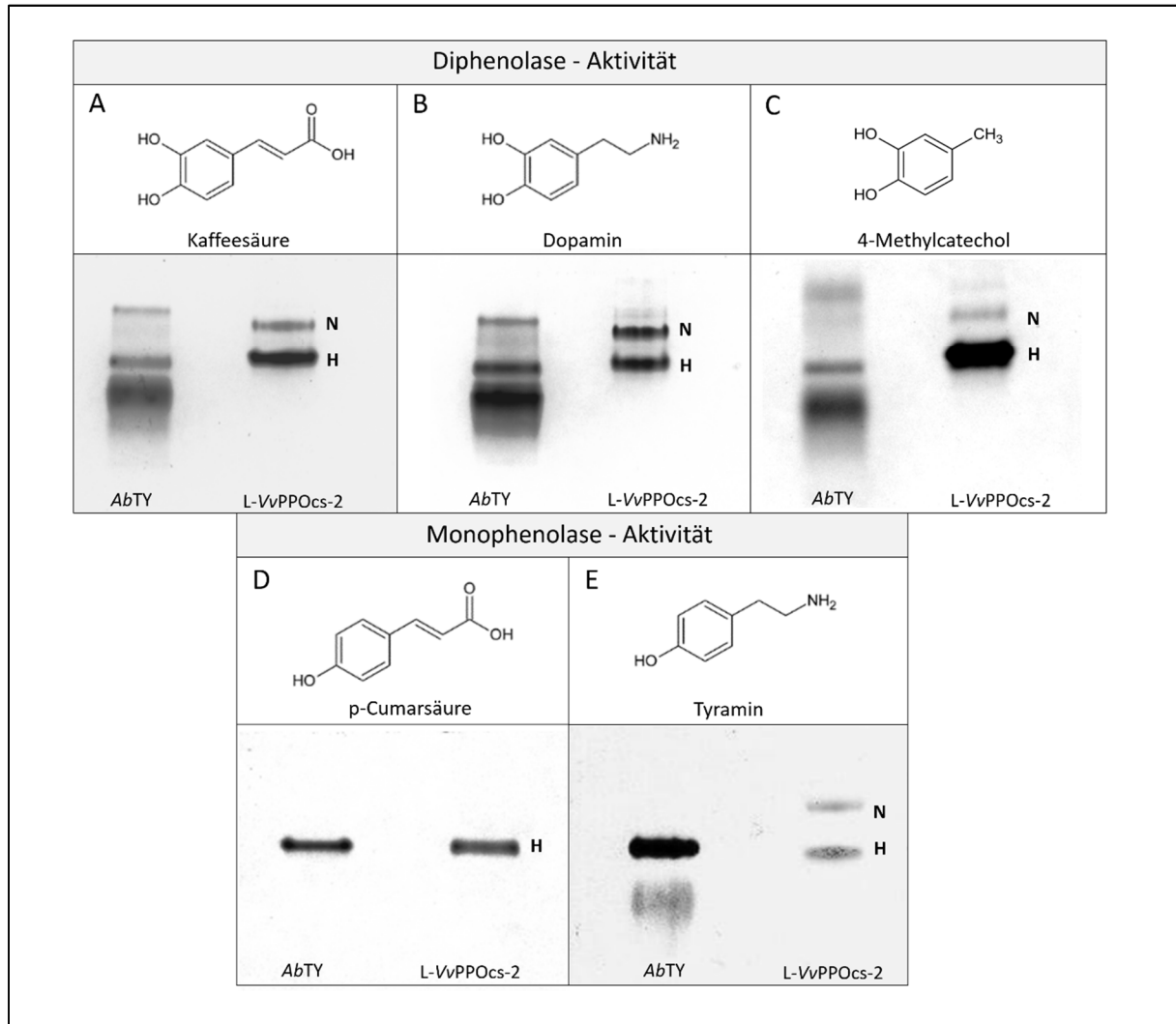


Abb. 13: Aktivitätsfärbung des rekombinanten L-VvPPOcs-2 in nativer PAGE (10 %) (A) - (C) Diphenolase-Aktivität, (D) u. (E) Monophenolase-Aktivität. Eingesetzt wurde jeweils 10 μ g des rekombinanten L-VvPPOcs-2. Nach durchgeführter Elektrophorese erfolgte die Aktivierung der latenten Enzyme, durch Equilibrierung der Polyacrylamidgele in Waschpuffer (100 mM Maleat-Tris, pH 5,5 und 1,5 mM SDS). Die nachträgliche Aktivitätsfärbung wurde durch Zusatz von jeweils 10 mM der entsprechenden Mono- und Diphenole initiiert. Um die Sensitivität des Assays zu erhöhen, wurden die Substratlösungen mit jeweils 10 mM MBTH versetzt. Als Kontrolle wurde 5 μ g der oligomeren *Agaricus bisporus* Tyrosinase (*AbTY*) eingesetzt. Nach Elektrophorese und Aktivitätsfärbung mit den Diphenolen Kaffeesäure (A), Dopamin (B) und 4-Methylcatechol (C), sowie des Monophenols Tyramin (D) ist das Auftreten mehrerer aktiver Enzympopulationen charakteristisch. Diese sind für die Kontrolle (*AbTY*) und für L-VvPPOcs-2 durch ein multiples Bandenmuster gekennzeichnet. Für die diphenolischen Substrate und Tyramin lassen sich zwei Aktivitätsbanden H (Hauptbande) und N (Nebenbande) erkennen. Bei *AbTY* sind hingegen eine Haupt- und zwei Nebenbanden zu erkennen. Eine Ausnahme stellt das Substrat p-Cumarsäure (D) dar, hier erschien nach Substratinkubation sowohl für *AbTY*, als auch für L-VvPPOcs-2 jeweils eine solitäre Aktivitätsbande (H).

Nach elektrophoretischer Trennung in nativer PAGE und nachträglicher Aktivitätsfärbung war das Auftreten eines multiplen Bandenmusters charakteristisch für das rekombinante L-VvPPOcs-2 (Abb. 13 A, B, C und E). Bei Umsatz der verschiedenen Diphenole sowie des Monophenols Tyramin, erschienen

im zeitlichen Verlauf zunächst die unteren Aktivitätsbanden (H in Abb. 13) mit hoher Intensität. Die übrigen Aktivitätsbanden (N in Abb. 13) waren abhängig von den eingesetzten Substraten, nach weiterer Inkubation von 5-45 min als Nebenbanden erkennbar. Für die Diphenolase-Aktivität ließ sich generell beobachten, dass L-VvPPOcs-2 die höchste Aktivität für das artifizielle und daher unphysiologische Substrat 4-MC zeigte. Hierbei ergab sich unmittelbar nach dem Transfer der Gele in die Substratlösung starke Farbreaktionen, welche als prominente Bande für die Aktivität des elektrophoretisch aufgetrennten Hauptproteinanteils sichtbar wurde. Die potentiell physiologischen Substrate Dopamin und Kaffeesäure induzierten ebenfalls hohe Aktivitäten, jedoch erst nach Inkubation von 5-10 min. Zusätzlich waren die Nebenbanden stärker ausgeprägt. Anhand der Analysen mittels SDS-PAGE, konnte für das gereinigte L-VvPPOcs-2 eindeutig gezeigt werden, dass es sich um homogene Proteinproben handelt (siehe 1.1.3, Abb. 12). Daher ist auszuschließen, dass die beschriebenen Unterschiede im Laufverhalten der Haupt- und Nebenbanden durch Proteinpopulationen unterschiedlicher Masse verursacht werden. Im Allgemeinen ist die elektrophoretische Mobilität eines Proteins in nativer PAGE überwiegend durch die spezifische Oberflächenladung determiniert. Daher könnten die beobachtete Heterogenität des Laufverhaltens, durch unterschiedliche Konformationszustände des rekombinanten L-VvPPOcs-2 und daraus resultierende Änderungen der Ladungsverteilungen auf der Proteinoberfläche verursacht sein.

Die Experimente zur Tyrosinase-Aktivität von L-VvPPOcs-2 zeigten zum ersten Mal eine rekombinante pflanzliche PPO mit ausgeprägter Monophenolase-Aktivität. Allerdings fiel diese, gegenüber den eingesetzten diphenolischen Substraten, schwächer aus. Zudem war besonders für Tyramin eine deutliche lag-Phase von ca. 20 - 30 min zu beobachten. Nach Aktivierung war der enzymatische Umsatz jedoch für die Substrate Tyramin und *p*-Cumarsäure, durch klar definierbare Aktivitätsbanden zweifelsfrei nachweisbar. Für *p*-Cumarsäure erwies sich L-VvPPOcs-2 als besonders aktiv, was sich durch solitäre und scharf abgegrenzte Aktivitätsbanden äußerte (Abb. Als weitverbreiteter, sekundärer Pflanzenstoff, welcher auch als Hydroxymzimtsäure bekannt ist, könnte *p*-Cumarsäure auch ein natürliches Substrat für pflanzliche PPOs darstellen. Der Nachweis einer Diphenolase-Aktivität mittels 4-MC war für das rekombinante L-VvPPOcs-3 ebenfalls eindeutig. Auffällig hierbei war die etwas geringere elektrophoretische Mobilität des L-VvPPOcs-3 gegenüber der Hauptbande des L-VvPPOcs-2 und AbTY (siehe Abb. 14). Auch schien die allgemeine Aktivität von L-VvPPOcs-3 im Vergleich zu L-VvPPOcs-2 um Nuancen schwächer auszufallen. Für den Nachweis der Monophenolase-Aktivität unter Einsatz des Substrats *p*-Cumarsäure, ließ sich keine spezifische-Aktivität nachweisen. Auch für Tyramin (Daten nicht gezeigt), zeigte das rekombinante L-VvPPOcs-3 keine nennenswerte Aktivität.

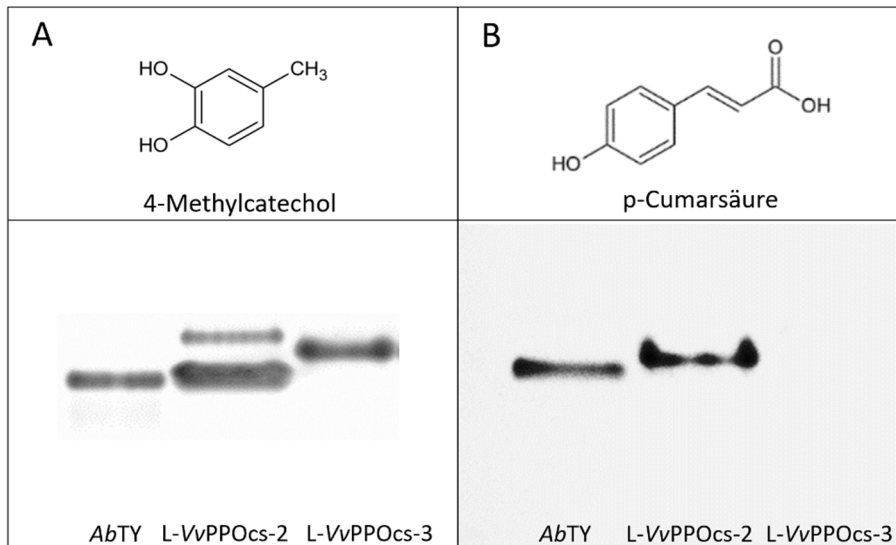


Abb. 14: Aktivitätsfärbung des rekombinanten L-VvPPOcs-2 und L-VvPPOcs-3 in nativer PAGE (10 %). Für den qualitativen Nachweis des Umsatzes der Substrate 4-MC und *p*-Cumarsäure wurde jeweils 15 µg des rekombinanten L-VvPPOcs-2 und L-VvPPOcs-3 genutzt. Zusätzlich wurden für die Versuche 3 µg *A. bisporus* Tyrosinase (AbTY) aufgetragen. Die Konzentrationen der eingesetzten Substrate betragen jeweils 10 mM. Für die Detektion der Monophenolase-Aktivität wurde die Substratlösung zusätzlich mit 10 mM MBTH versetzt. (A) Aktivitätsfärbung nach Inkubation mit 4-Methylcatechol für 10 min. Während L-VvPPOcs-3 eine solitäre Bande aufweist, ist für L-VvPPOcs-2 das charakteristische Auftreten der zwei aktiven Proteinpopulationen zu erkennen. (B) Nachweis der Monophenolase-Aktivität mittels *p*-Cumarsäure und Inkubation für ca. 45 min. Hier konnte für L-VvPPOcs-3 keine spezifische Aktivität beobachtet werden.

1.3.5 Bestimmung der pH Optima von L-VvPPOcs-2 beim katalytischen Umsatz von 4-Methylcatechol in An- und Abwesenheit des Aktivators SDS

Die Bestimmung der pH Optima und die in Kapitel 2 vorgestellten Kinetiken sowie biochemische Analysen zu den drei Muteinen (F259G, F259V und F259L) wurden im Rahmen einer durch mich betreuten Masterarbeit in Zusammenarbeit mit [REDACTED] durchgeführt und ausgewertet (Ludwig, 2014).

Die Bestimmung der pH-Optima erfolgte unter Einsatz von 10 mM 4-Methylcatechol bei 14 verschiedenen pH-Werten. Hierfür wurde ein pH-Bereich von pH 2 bis pH 9 berücksichtigt. Die Messungen erfolgten in einem Intervall von 0,5 pH-Einheiten und wurden bei 25 °C durchgeführt. Als Puffersystem für den Teilbereich von pH 2 - 3,5 wurde ein 100 mM Citrat-Puffer und für den Teilbereich zwischen pH 4 – 9 ein 100 mM Maleat-Tris-Puffer genutzt. Der Aktivator SDS wurde für die Bestimmung des pH-Optimums in festen Konzentrationen von 1,5 mM, eingesetzt. Die Experimente der beiden Versuchsreihen (+/- SDS) wurden als Doppelbestimmung durchgeführt und die Änderungen der OD für die einzelnen Versuchsreihen bei einer substratspezifischen Wellenlänge von 405 nm photometrisch verfolgt. Die spezifischen Aktivitäten konnten anhand des bekannten Extinktionskoeffizienten des

Chinon-Produkts ($1090 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, pH 3,5; Dirks-Hofmeister et al., 2012) mittels Lambert-Beer'schen Gesetz abgeschätzt werden (Daten nicht aufgeführt).

Die Auswertungen der Versuchsreihen ergaben für L-VvPPOcs-2 ohne Zusatz von SDS einen messbaren enzymatischen Aktivitätsbereich zwischen pH 2,5 – 5,5 (siehe Abb. 15). Nach säureinduzierter

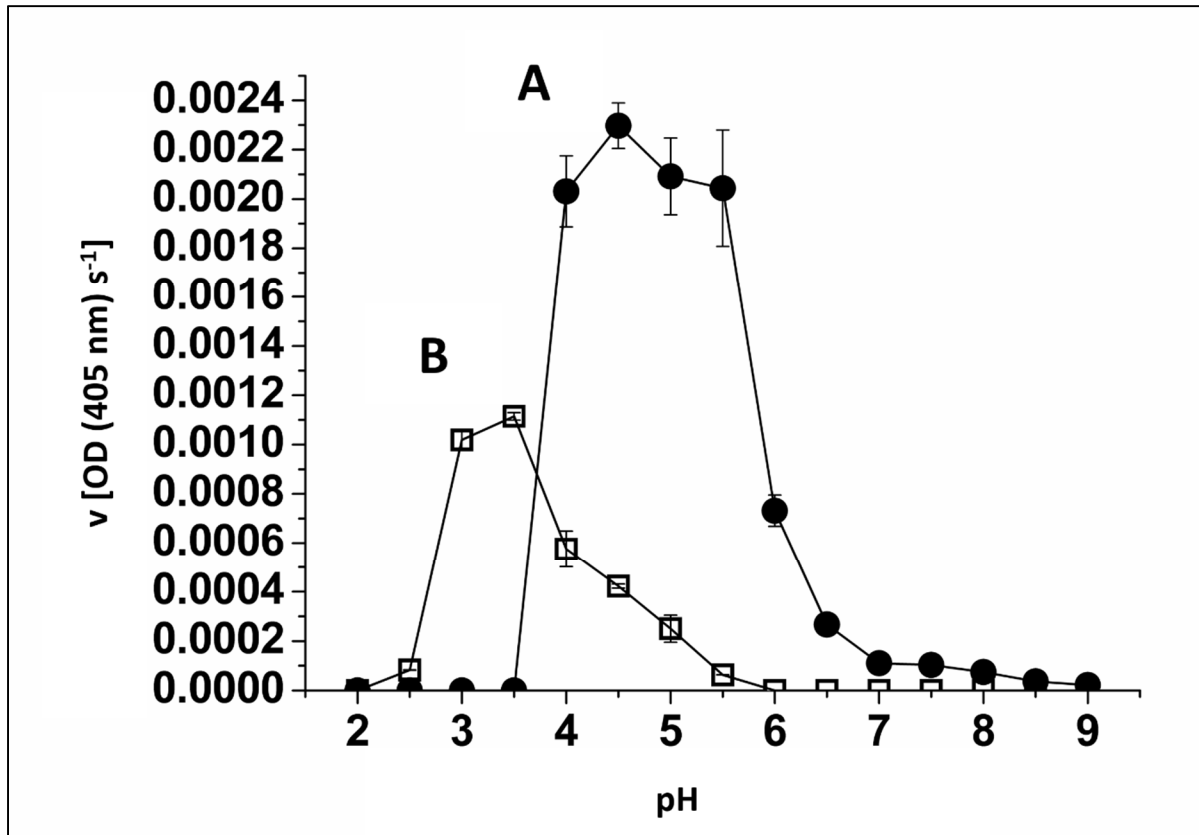


Abb. 15: pH Abhängigkeit der katalytischen Geschwindigkeit v der rekombinanten L-VvPPOcs-2 in An- und Abwesenheit des künstlichen Aktivators SDS. An Substrat wurden 10 mM 4-MC eingesetzt. Die Konzentration des rekombinanten L-VvPPOcs-2 betrug jeweils $1,8 \mu\text{M}$ und die photometrische Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 405 nm. Für den pH-Bereich 2 – 3,5 wurde ein 100 mM Citrat-Puffer verwendet, während die Messungen für den Bereich pH 4 – 9 in 100 mM Maleat-Tris erfolgte. Die ermittelten Geschwindigkeiten des Substratumsatzes v wurden gegen den pH der entsprechenden Messreihen graphisch aufgetragen. Die Fehlerbalken geben die Abweichung vom Mittelwert aus der Doppelbestimmung an. (A) Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeiten beim Umsatz von 4-MC in Abhängigkeit des herrschenden pH-Milieus und Anwesenheit des Aktivators SDS. Hier lässt sich ein pH-Optimum bei pH 4,5 definieren. (B) Graphischer Verlauf der Reaktionsgeschwindigkeiten bei Abwesenheit von SDS. Hierbei verschiebt sich das pH-Optimum auf pH 3,5 (siehe auch Ludwig, 2014).

Aktivierung, lag hier das pH-Optimum bei pH 3,5. Für pH 2 sowie den Teilbereich zwischen pH 6 – 9, konnte hingegen keine spezifische enzymatische Aktivität detektiert werden. Bei Zusatz von 1,5 mM SDS ergaben sich hohe messbare Aktivitäten über einen pH-Bereich von pH 4 – 6. Im Vergleich zu den Experimenten mit SDS-freien Puffersystemen, zeigte sich eine Verschiebung des pH-Optimums um eine pH-Einheit auf pH 4,5, während bei pH 3,5 keine nennenswerte Aktivität zu erkennen war. Zudem wies das rekombinante L-VvPPOcs-2 bei Aktivierung mit SDS und Umsatz von 4-MC einen breiteren pH-abhängigen Aktivitätsbereich auf, was sich durch ein weniger scharf abgrenzbares pH-Optimum und hohe Aktivitäten über einen Bereich von zwei pH-Einheiten zeigte.

2. Auswirkung des *Gate-Residues* auf die katalytische Aktivität des rekombinanten L-VvPPOcs-2

Während Tyrosinasen die *ortho*-Hydroxylierung und Zwei-Elektronen-Oxidation von Monophenolen zu *o*-Chinonen vermitteln, katalysieren Catecholoxidasen ausschließlich die Oxidation von Diphenolen. Eine mögliche Erklärung für diese Restriktion geht aus einer Arbeit hervor, welche von Klabunde et al. (1998) vorgestellt wurde. Ausgehend von der gelösten Kristallstruktur der Catecholoxidase *lbCO-1* aus *I. batatas* (PDB-ID: 1BT3) wurde ein besonderes Augenmerk auf die Anwesenheit eines für viele pflanzliche PPOs konservierten Phenylalanins (F261) gelegt. Dieses besetzt bei *lbCO-1* eine kritische Position am Zugang zum katalytischen Dikupfer-Zentrum. Hierbei wird das CuA-Motiv partiell abgeschirmt. In diesem Zusammenhang wurde diskutiert, dass durch die Sperrigkeit des Phenylrests der Zutritt zum Kupferzentrum für bestimmte Substrate kontrolliert werden könnte (Klabunde et al., 1998; Eicken et al., 1999, Gerdemann et al., 2002a, Gerdemann et al., 2002b). Aufgrund dieser postulierten Schrankenfunktion wurde das entsprechende Phenylalanin als *Gate-Residue* bezeichnet (Eicken et al., 1999, Marusek et al., 2006).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die Auswirkung des *Gate-Residues* auf die katalytische Aktivität anhand des rekombinanten L-VvPPOcs-2 untersucht werden. Mittels PCR-basierter, ortsgerechter Mutagenese sollte das *Gate-Residue* (F259) der latenten rekombinanten L-VvPPOcs-2 durch Aminosäuren substituiert werden, welche sich durch Seitenketten mit geringeren raumfüllenden Eigenschaften auszeichnen. In Vorversuchen konnte für L-VvPPOcs-2 mittels qualitativem biochemischen MBTH-Assays und Aktivierung mit SDS bereits eine eindeutige Monophenolase-Aktivität gezeigt werden (siehe Kapitel 1.1.3).

Dieses Ergebnis wurde durch eine kürzlich veröffentlichte Arbeit am Beispiel spezifischer PPOs aus Riesling und Dornfelder Trauben gestützt (Fronk et al., 2015). Hierbei konnte anhand einer biochemisch gereinigten PPO aus *V. vinifera* L. cv. Riesling, ebenfalls eindeutige Monophenolase-Aktivitäten gezeigt werden. Jedoch stehen diese Resultate im offensichtlichen Widerspruch zu den Beobachtungen von Virador et al. (2010), wonach biochemisch isoliertes und angereichertes VvPPOg (cv. Grenache) ausschließlich Diphenolase-Aktivität besaß. Die Ergebnisse zu den enzymatischen Aktivitäten von PPOs aus den Cultivaren Cabernet Sauvignon und Riesling geben aber sichere Hinweise darauf, dass das *Gate-Residue* (F259) in PPOs aus der Weinrebe nicht alleinig für die Repression der Monophenolase-Aktivität verantwortlich gemacht werden kann.

Ein weiteres Charakteristikum von L-VvPPOcs-2 zeigte sich beim enzymatischen Umsatz der Monophenole *p*-Cumarsäure und Tyramin gegenüber den Diphenolen Dopamin sowie 4-Methylcatechol. Hier war die Diphenolase-Aktivität deutlich stärker ausgeprägt als die Monophenolase-Aktivität. Nach Austausch des *Gate-Residues* durch Aminosäuren mit geringeren

sterischen Eigenschaften, müsste daher der Zugang für die Monophenole optimiert werden und eine deutliche Erhöhung der Monophenolase-Aktivität zu erwarten sein.

Die Aminosäuren, durch welche F259 mittels ortsgerichteter Mutagenese ausgetauscht werden sollten, wurden anhand bekannter Tyrosinasen aus Pilzen und Bakterien abgeleitet. Hier wurden Glycin sowie die beiden hydrophoben Aminosäuren Valin und Leucin gewählt. Dabei entspricht Glycin dem *Gate-Residue* in der Tyrosinasestruktur des Bakteriums *S. castaneoglobisporus* (TySc PDB-ID: 3AWX, G204). Valin hingegen besetzt analoge Positionen in den Strukturen einer weiteren bakteriellen Tyrosinase von *B. megaterium* (PDB-ID: 3NM8, V218) und den Tyrosinasen der Pilze *A. bisporus* (PDB-ID: 2Y9W, V283) und *A. oryzae* (PDB-ID: 3W6W, V359). Beispiele für Leucin-Varianten finden sich bei einigen pflanzlichen PPOs und bei verschiedenen Tyrosinasen der Pilze (Marusek et al., 2006).

2.1 Ortsgerichtete Mutagenese am Gate-Residue

Die Herstellung der spezifischen Konstrukte für die Expression der gewünschten Muteine erfolgte mittels PCR-basierter, ortsgerichteter Mutagenese und wurde mit Hilfe eines adaptierten und optimierten *KOD*-Mutagenese Protokolls (Toyobo, Osaka, Japan) durchgeführt. Hierfür wurden genspezifische 5'-phosphorylierte Primer generiert (siehe Anhang G 2.), welche die für die entsprechenden Aminosäuresubstitutionen kodierenden mutagenen Triplets (G: GGC, V: GTC, L: TTG) enthielten. Diese waren dem *Codon-Usage* von *E. coli* angepasst. Für die inverse PCR wurde das L-VvPPOcs-2-pET-51b(+)-Expressionskonstrukt (Wildtyp) als Matrize verwendet. Die Analyse der linearisierten PCR-Produkte erfolgte mittels Agarosegel-Elektrophorese (siehe Abb. 16). Die methylierten parentalen Wildtyp-Matrizen wurden anschließend mittels *DpnI* selektiv verdaut und die linearisierten PCR-Produkte unter Verwendung von T4-DNA-Ligase (Promega, Mannheim) rezirkularisiert. Die erhaltenen Vektoren wurden schließlich in chemisch kompetente *E. coli* One Shot® TOP10 (Invitrogen™, Life Technologies, Darmstadt) oder NovaBlue-Singles™ (Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt) transformiert und nach Plasmidvermehrung und Isolierung mittels Sanger-Sequenzierung überprüft (StarSEQ, Mainz).

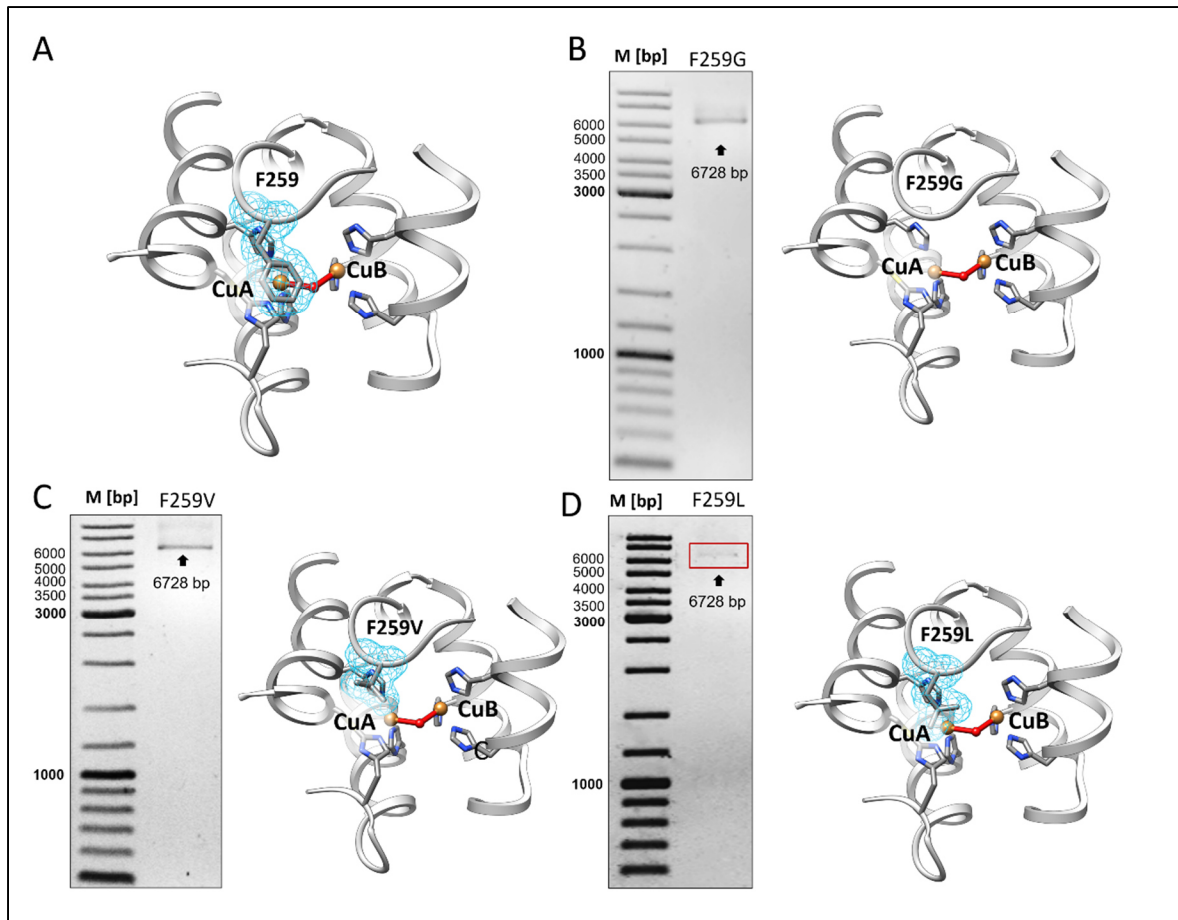


Abb. 16: Übersicht über die mittels ortsgerechter Metagenese erzeugten Expressionskonstrukte der F259L, F259V und F259G-Muteine. (A) „4- α -Helix- Bündel-Motiv“ der gelösten VvPPOg-Struktur (PDB-ID: 2P3X). Gezeigt sind die sechs Cu-koordinierenden Histidine an der CuA und CuB-Bindungsstelle. Zusätzlich ist das *Gate-Residue* mit der überlagerten Elektronendichte (cyan) am Phenylring des Phenylalanins (F259) gezeigt. Anhand dieser soll die sterische Abschirmung der CuA-Bindungsstelle verdeutlicht werden. (B) – (D) Agarosegele (0,9 %) für die Detektion der linearisierten PCR-Produkte, welche unter Verwendung von mutagenen Primern erzeugt wurden. Anhand schwacher Banden (PCR-Produkt nach 20-25 Zyklen) konnten die jeweiligen mutierten Konstrukte für die F259G (B), F259V (C) und F259L-Muteine (C, roter Kasten) bei erwarteten Größen von ca. 6700 bp detektiert werden. Die resultierenden, abgeleiteten Aminosäuresubstitutionen sind in den Homologiemodellen neben den zugehörigen Agarosegelen dargestellt. Diese Modelle wurden auf Basis der VvPPOg-Struktur mit Hilfe des Programms Modeller Version 9.15 (Sali und Blundell, 1993; Pettersen et al., 2004; Goddard et al., 2007) konstruiert. [Verwendeter Marker: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte)]

2.2 Rekombinante Expression der F259-Muteine

Die Expression der erzeugten Mutein-Konstrukte F259L, F259V und F259G erfolgte unter den in 1.1.3 beschriebenen Bedingungen für den L-VvPPOcs-2-Wildtyp (WT). Hierfür wurden die entsprechenden Konstrukte in chemisch kompetente *E. coli* Rosetta™ 2(DE3)pLysS (Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt) eingebracht. Die Medien, welche für die Proteinexpression vorgesehen waren, wurden jeweils mit 250 μ M CuCl₂ versetzt. Nach affinitätschromatographischer Reinigung konnten die rekombinanten Strep-Tag II-Fusionsproteine mit einer Reinheit von 90-95 % gewonnen werden (siehe Abb. 17).

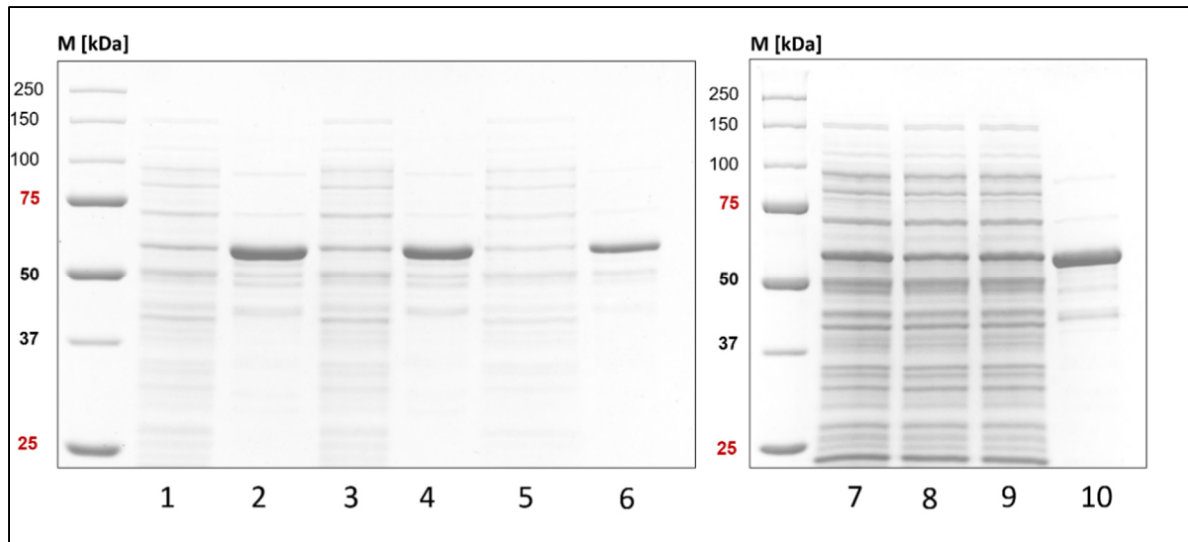


Abb. 17: Nachweis der rekombinant exprimierten Muteine (F259G, F259V und F259L), sowie des L-VvPPOcs-2-Wildtyps durch SDS-PAGE (10 %) nach affinitätschromatographischer Reinigung. Die Spuren 1 (WT), 3 (F359V), 5 (F259G) und 7 (F259L) zeigen jeweils die geklärten Lysate vor Säulendurchlauf. Neben den bakteriellen Begleitproteinen von *E. coli*, sind die überexprimierten rekombinanten PPOs bei ca. 60 kDa als scharfe Banden deutlich zu erkennen. Die Spuren 2 (WT), 4 (F359V), 6 (F359G) und 10 (F259L) zeigen die jeweiligen aufkonzentrierten Eluatfraktionen nach affinitätschromatographischer Reinigung. Hier konnten die entsprechenden rekombinanten Proteine bei ca. 60 kDa in hoher Reinheit, anhand prominenter Banden detektiert werden. Zusätzlich zeigen die Spuren 8 und 9 zwei gesammelte Fraktionen vom geklärten Lysat des F259L-Muteins nach dem Säulendurchlauf. Noch deutlich konnte hier ungebundenes rekombinantes Protein detektiert werden. [Verwendeter Marker: PrecisionPlus™ Prestained Dual Color (BIO-RAD, München), Färbung: Coomassie-Brillant-Blau nach Kang et al. (2002)]

2.3 Enzymkinetik der Diphenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2-Wildtyps und der F259-Muteine

Die Bestimmung der Enzymkinetiken des rekombinanten L-VvPPOcs-2-Wildtyps sowie der drei Muteine (F259G, F259V und F259L) für den Umsatz der diphenolischen Substrate Dopamin (DO) und 4-Methylcatechol (4-MC) erfolgte jeweils in Doppelbestimmung. Das Modellsubstrat 4-MC wurde hierfür in 8 Konzentrationen von 0,1 – 50 mM in einem Maleat-Tris-Puffer (100 mM Maleat-Tris, pH 4,5) eingesetzt und die Änderungen der OD bei 405 nm photometrisch verfolgt. Um die enzymatischen Parameter (v_{\max} und K_M , siehe Tabelle 24) bestimmen zu können wurde ein molarer Extinktionskoeffizient des Chinonprodukts von $\epsilon_{405} = 1090 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ nach Dirks-Hofmeister et al. (2012) eingesetzt. Auf diese Weise konnte mittels Lambert-Beer'schen Gesetz auf die Konzentration der Chinonprodukte geschlossen werden. Aktiviert wurden die latenten Enzyme mit jeweils 1,5 mM SDS (Natriumdodecylsulfat). Die Umsatzgeschwindigkeiten wurden durch den steilsten Anstieg der Absorptionsänderungen in den ersten Minuten der entsprechenden Kinetiken definiert.

Bei den Aufzeichnungen der Messergebnisse war bereits frühzeitig zu beobachten, dass die Reaktionsgeschwindigkeiten bei hohen Substratkonzentrationen ($[S] > 10 \text{ mM}$) stark abnahmen, was auf eine Substratinhibition bzw. Produktinhibition hindeutet. Ähnliches wurde bereits für rekombinantes L-ToPPO-6 aus *T. officinale* berichtet (Dirks-Hofmeister et al., 2012). Entsprechend

erfolgte die Anpassung über nichtlineare Regression an die ermittelten Umsatzgeschwindigkeiten unter Verwendung einer modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung (siehe Kapitel B 8.9, Gleichung 2), welche Produktinhibition berücksichtigt (siehe Abb. 18, A). Bei niedrigen Substratkonzentrationen ($[4\text{-MC}] = 0,1 - 10 \text{ mM}$), für welche keine Produkthemmungen registriert werden konnten, wurde die Anpassungen mit Hilfe der allgemeine Michaelis-Menten-Gleichung (siehe Kapitel B 8.9, Gleichung 1) vorgenommen (siehe Abb. 18, B).

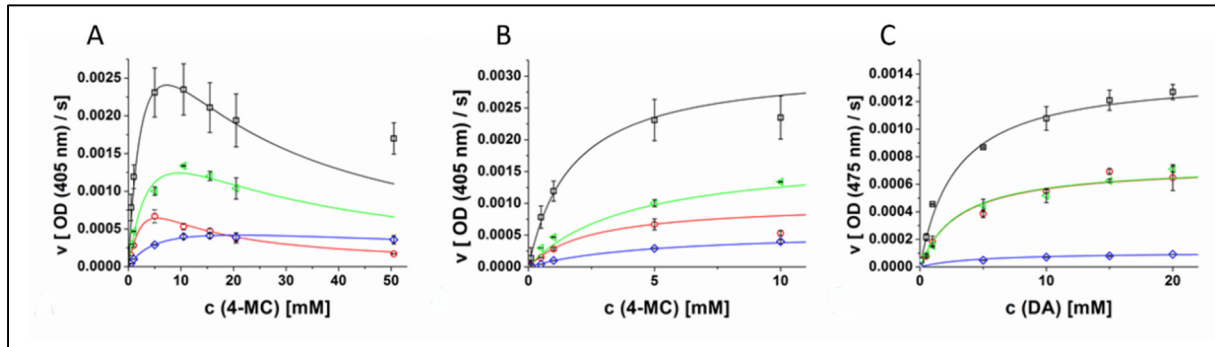


Abb. 18: Verlauf der Umsatzgeschwindigkeiten des rekombinanten WT sowie der drei Muteine (F259G, F259V und F259L) in Abhängigkeit von den Konzentrationen der eingesetzten Diphenole 4-Methylcatechol und Dopamin. Schwarz: Wildtyp (WT, grün: F259V, rot: F259L, blau F259G). Die biochemisch angereicherten Enzymlösungen wurden für die Versuchsreihen in Konzentrationen von jeweils $1,8 \mu\text{M}$ eingesetzt. Die Aktivierung der latenten Enzyme erfolgte durch Zugabe von $1,5 \text{ mM}$ SDS in 100 mM Maleat-Tris, $\text{pH } 4,5$. Alle Messungen wurden bei RT durchgeführt. Die Fehlerbalken geben die Abweichung aus der Doppelbestimmung an. Bei Substrat- bzw. Produktinhibition (A) für das Substrat 4-MC wurden die jeweiligen Kurven durch nichtlineare Regression mit Hilfe des Excel Add-Ins Solver unter Verwendung der Michaelis-Menten-Gleichung für Substratinhibition angepasst. Für (B) und (C) erfolgte die Anpassung für die Konzentrationsbereiche von $0,1 - 10 \text{ mM}$ (4-MC, B) bzw. $0,1 - 20 \text{ mM}$ (DO, C) mit Hilfe der allgemeinen Michaelis-Menten-Gleichung. (A) Verlauf der Umsatzgeschwindigkeiten in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration ($0,1 - 50 \text{ mM}$) des Substrats 4-MC. Für hohe Substratkonzentrationen ($[4\text{-MC}] > 10 \text{ mM}$) konnte hierbei eine starke Erniedrigungen der Umsatzgeschwindigkeiten sowohl für den WT, als auch für die Muteine F239L (grün) und F259V (rot) beobachtet werden. (B) Ermittelte Umsatzgeschwindigkeiten für den Bereich von $0,1 - 10 \mu\text{M}$ des eingesetzten Substrats 4-MC ohne Berücksichtigung von Produkthemmung. (C) Verlauf der Umsatzgeschwindigkeiten für den Bereich von $0,1 - 20 \text{ mM}$ des eingetzten Substrats DO (siehe auch Ludwig, 2014).

Tab. 24: Enzymatische Parameter der Enzymkinetiken des L-VvPPOcs-2-Wildtyps und der drei Muteine für die eingesetzten Diphenole 4-Methylcatechol und Dopamin. Die Berechnung der enzymatischen Parameter erfolgte mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung der allgemeinen Michaelis-Menten Gleichung (siehe Gleichung 1). Die Berechnung der enzymatischen Parameter erfolgte mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung der allgemeinen Michaelis-Menten Gleichung (siehe Kapitel B 8.9, Gleichung 1). Die Fehler repräsentieren die Abweichungen aus der Doppelbestimmung.

Substrat	Parameter	WT	F259G	F259V	E259L
4-MC	$v_{\max} [\mu\text{M s}^{-1}]$	$9,8 \pm 0,9$	$1,8 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,2$	$3,1 \pm 0,21$
	$K_M [\text{mM}]$	$1,7 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,7$	$4,0 \pm 1,3$	$2,5 \pm 0,3$
DO	$v_{\max} [\mu\text{M s}^{-1}]$	$1,4 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$
	$K_M [\text{mM}]$	$2,8 \pm 0,1$	$4,5 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,1$	$3,0 \pm 0,1$

Für die Aufzeichnung der Kinetiken zur Katalyse von Dopamin (DO) wurden die Änderungen der OD, dem spezifischen Absorptionsmaximum von Dopaminochrom folgend, bei 475 nm aufgezeichnet. Um die enzymatischen Parameter (v_{\max} und K_M) abschätzen zu können wurde der bekannte Extinktionskoeffizient des Dopaminochroms $\epsilon_{480} = 3300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ für die Berechnung der Produktkonzentrationen verwendet (Muñoz et al., 2006). Für den enzymatischen Umsatz von DO

konnte keine Produktinhibition festgestellt werden. Zudem konnte für hohe Konzentrationen ($[DO] > 20 \text{ mM}$) in den einzelnen Messreihen starke Zunahmen der aufgezeichneten Absorptionen beobachtet werden, was vermutlich auf die Bildung des Produkts Melanin zurückzuführen war. Daher konnte dieser Teilbereich für die Bestimmung der jeweiligen Umsatzgeschwindigkeiten nicht mit einbezogen werden. Für den L-VvPPOcs-2-Wildtyp ergaben sich erneut Aktivitäten, die im Vergleich zu den entsprechenden Muteinen signifikant höher waren (siehe Abb. 18, C). Wie aus Abb. 18 (C) ersichtlich wird, lagen die Regressionskurven der F259L- und F259V-Muteine sehr dicht beieinander, was auf annähernd identische Aktivitäten schließen lässt. Das F259G-Mutein zeigte hingegen abermals die geringsten Aktivitäten auf.

2.4 Enzymkinetik der Monophenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2-Wildtyps und der F259-Muteine

Die Bestimmung der Enzymkinetik für den Umsatz von Tyramin (Tyr) und *p*-Cumarsäure (*p*-CA) erfolgte in Doppelbestimmung. Für Tyramin wurden Substratkonzentrationen von 0,5 – 100 mM pH 4,5 gewählt und die Enzyme analog zu 2.3 mit 1,5 mM SDS aktiviert. Die photometrischen Messungen erfolgten bei 475 nm. Da bei Umsatz von Tyramin das zu erwartende Katalyseprodukt übereinstimmend mit dem in 2.3 erwähnten Dopaminochroms ist, wurde für die Berechnung der Produktkonzentration ebenfalls der molare Extinktionskoeffizient $\epsilon_{480} = 3300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ genutzt.

In den einzelnen Versuchsreihen wiesen die rekombinanten Enzyme eine deutliche lag-Phase auf. Für den L-VvPPOcs-2-Wildtyp betrug diese ca. 20-30 min, wie in 1.3.1 bereits beobachtet werden konnte. Die Muteine F259L und F259V, welche gegenüber dem Wildtyp eine deutlich niedrigere Aktivität aufwiesen, zeigten eine stärkere Ausprägung von ca. 60 min. Zudem konnte für Substratkonzentrationen ab 20 mM ein deutlicher Abfall der Absorptionen detektiert werden, was ähnlich wie bereits für die Katalyse des Diphenols 4-MC geschildert, ein Hinweis auf Produktinhibition ist (siehe Abb. 19, A, B und E). Anhand der Regressionskurve des L-VvPPOcs-2-Wildtyps konnte dies ebenso, wenn auch bedeutend schwächer, beobachtet werden (Abb. 19, A). Das F259G-Mutein zeigte hingegen keine detektierbare Aktivität für den Umsatz von Tyramin.

Die kinetischen Untersuchungen zur Katalyse von *p*-Cumarsäure erfolgten unter Einsatz von MBTH (3-Methyl-2-benzothiazolinon-hydrazonhydrochlorid). Ein Nachteil des Assays ist die schwere Löslichkeit des MBTHs in wässriger Lösung. Deshalb war es erforderlich das verwendete Puffersystem mit 2 % DMSO zu versetzen, um die gewünschten Endkonzentrationen zu erhalten. Bislang gibt es keine Hinweise darauf, dass DMSO in den eingesetzten Konzentrationen die enzymatische Aktivität von PPOs beeinträchtigen kann (Bauer, 2014).

Das Substrat *p*-Cumarsäure wurde in den einzelnen Versuchsreihen in 8 Konzentrationen von 0,05 – 5 mM eingesetzt. Zudem wurden die Reaktionsansätze jeweils mit 5 mM MBTH versetzt. Die

photometrischen Messungen erfolgten bei einer Wellenlänge von 505 nm. Bei Umsatz von *p*-Cumarsäure zeigte der Wildtyp die höchsten Aktivitäten, gefolgt von F259L mit signifikant geringeren Umsatzgeschwindigkeiten (siehe Abb. 19 E, F). Für F259V hingegen

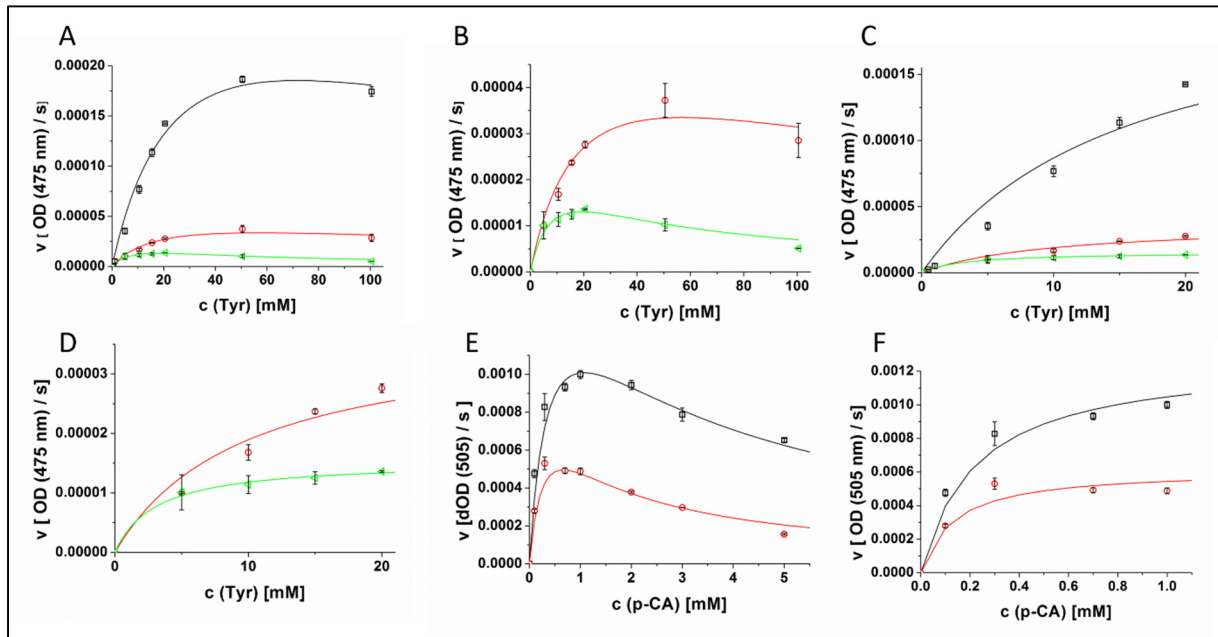


Abb. 19: Verlauf der ermittelten Umsatzgeschwindigkeiten des rekombinanten WT sowie der drei Muteine (F259G, F259V und F259L) in Abhängigkeit von den eingesetzten Konzentrationen der Monophenole *p*-Cumarsäure und Tyramin. Schwarz: Wildtyp (WT, grün: F259V, rot: F259L, blau F259G). Für die einzelnen Versuchsreihen wurden die rekombinanten Enzyme in Konzentrationen von jeweils 1,8 μM eingesetzt. Die Aktivierung erfolgte analog zu 2.3 durch Zusatz von 1,5 mM SDS in 100 mM Maleat-Tris, pH 4,5. Das Substrat Tyr (A-D) wurde in Konzentrationen von 0,1–100 mM eingesetzt und für *p*-CA erfolgten die Messungen in einem Konzentrationsbereich von 0,05- 1 mM. Um die Sensitivität des Assays zu erhöhen, wurde das Substrat *p*-CA zusätzlich mit jeweils 5 mM MBTH versetzt. Bei beobachteter Produktinhibition (B und E) wurden die Anpassungen an die ermittelten Umsatzgeschwindigkeiten erneut mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung der modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung vorgenommen. Zudem erfolgte eine Anpassung für die Konzentrationsbereiche ohne Produktinhibition an die allgemeine Michaelis-Menten Gleichung (C, D und F). Die Fehler geben die Abweichungen aus der Doppelbestimmung an (siehe auch Ludwig, 2014).

Tab. 25 Enzymatische Parameter der Kinetiken des L-VvPPOcs-2-Wildtyps und der drei Muteine für die eingesetzten Monophenole *p*-Cumarsäure und Tyramin. Die Berechnung der enzymatischen Parameter erfolgte mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung der allgemeinen Michaelis-Menten Gleichung (siehe Kapitel B 8.9, Gleichung 1). Die Fehler repräsentieren die Abweichungen aus der Doppelbestimmung.

Substrat	Parameter	WT	F259G	F259V	F259L
<i>p</i> -CA	v_{max} [$\mu\text{M s}^{-1}$]	$1,3 \cdot 10^{-3} \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$	-	-	$0,6 \cdot 10^{-3} \pm 0,1 \cdot 10^{-3}$
	K_M [d OD ₄₀₅ s ⁻¹]	$0,2 \pm 0,1$	-	-	$0,1 \pm 0,1$
Tyr	v_{max} [$\mu\text{M s}^{-1}$]	$0,22 \pm 0,06$	-	$0,02 \pm 0,02$	$0,04 \pm 0,01$
	K_M [mM]	$15,7 \pm 8,6$	-	$3,1 \pm 0,7$	$9,8 \pm 1,5$

waren die gemessenen Aktivitäten sehr niedrig und lediglich durch schwache Farbreaktionen visuell zu erkennen. Aufgrund des niedrigen Signal-Rausch-Verhältnisses waren die erhaltenen Spektren nicht auswertbar. Ähnlich, wie für die Kinetiken zur Katalyse von Tyramin berichtet, konnte für F259G keine spezifische Aktivität für die Katalyse von *p*-Cumarsäure nachgewiesen werden. Auch nach einer Inkubationszeit von ca. 12 - 16 h war kein Anzeichen einer enzymatischen Aktivität festzustellen.

Anhand der angepassten Regressionskurven des L-VvPPOcs-2-Wildtyps sowie des F259L-Muteins für Substratkonzentrationen ab 1 mM (siehe Abb. 19, C) war ein starker Rückgang der Umsatzgeschwindigkeiten charakteristisch, was erneut ein Zeichen für Produktinhibition ist.

2.5 Circular dichroismus-Spektroskopie

Für die Aufnahme der CD-Spektren wurden die Proteinlösungen jeweils in Konzentrationen von 0,2 mg/ml eingesetzt und lagen in einem 20 mM Phosphatpuffer pH 7,6 vor. Die Messungen der Einzelspektren erfolgte in Dreifachbestimmung für einen Spektralbereich von 190 – 260 nm und wurden im Anschluss gegen den Leerwert des Puffers korrigiert. Da die Enzymproben leichte

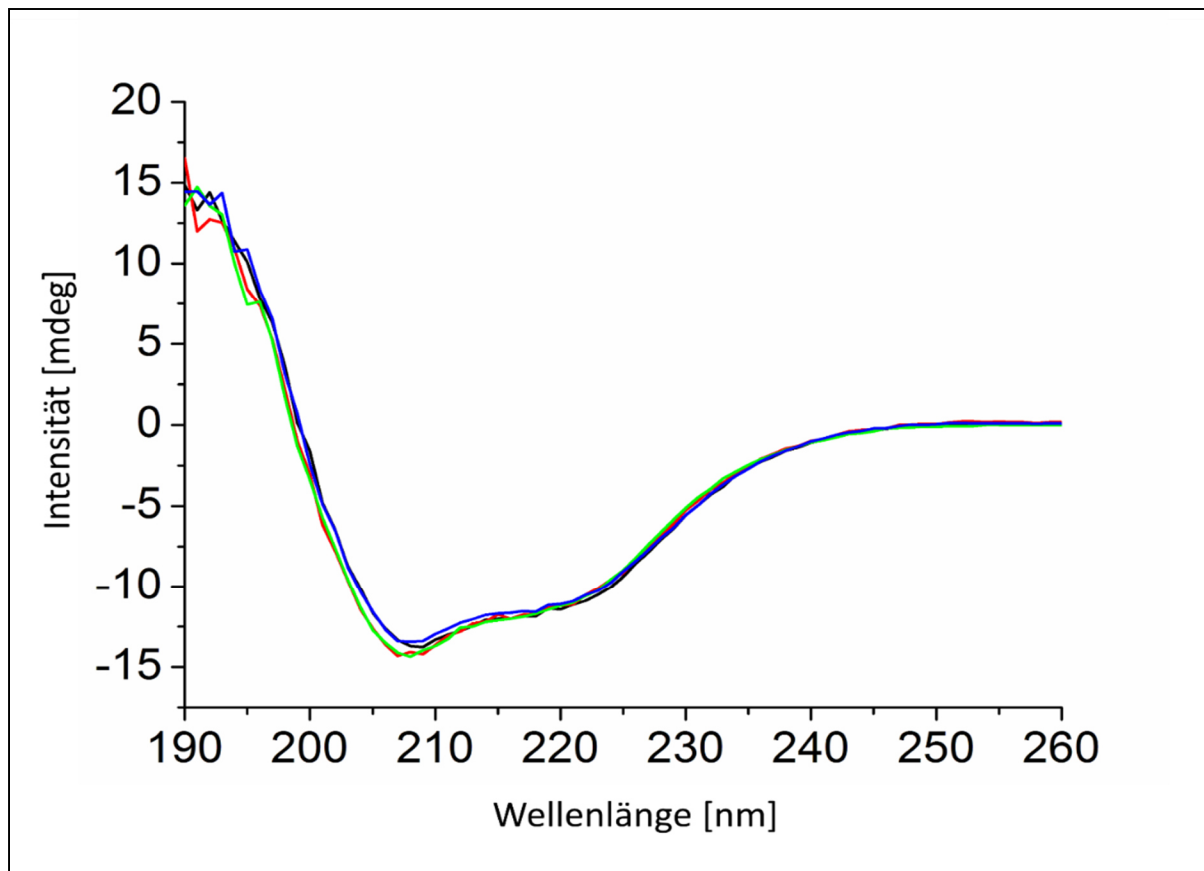


Abb. 20: CD-Spektrum des L-VvPPOcs-2-Wildtyps und der drei Muteine. Die Spektren wurden in einem Spektralbereich von 190 - 260 nm aufgezeichnet und gegen den Leerwert (verwendetes Puffersystem) korrigiert. Zudem wurden die Einzelspektren aus einer Dreifachbestimmung gemittelt. Bei der Auswertung wurde keine Datenglättung durchgeführt. Wie deutlich zu erkennen ist, sind im direkten Vergleich keine nennenswerten Unterschiede zwischen dem L-VvPPOcs-2-Wildtyp (schwarz) und den drei Muteinen (F259G, rot, F259L, grün, F259V, blau) festzustellen (siehe auch Ludwig, 2014).

Konzentrationsunterschiede aufwiesen, wurden die erhaltenen Einzelspektren der Muteine auf das CD-Spektrum des Wildtyps normiert. Alle Messungen erfolgten in Dreifachbestimmung. Wie in Abbildung 20 deutlich zu erkennen ist, ließen sich die erhaltenen Spektren exakt superpositionieren, was ein starker Hinweis darauf ist, dass die erzeugten Muteine gegenüber dem Wildtyp keine signifikanten Faltungsunterschiede aufwiesen.

3. Fixierung eines Wassermoleküls in der Proteinmatrix durch zwei konservierte Aminosäuren

Die kürzlich vorgestellten Kristallstrukturen der Tyrosinase des Bakteriums *B. megaterium* (4P6R, 4P6S, 4P6T) zeigten ein Wassermolekül, welches in unmittelbarer Nähe zur CuB-Bindungsstelle des aktiven Zentrums durch ein Glutamat (E195) und ein Asparagin (N205) über zwei Wasserstoffbrücken, in der Proteinmatrix fixiert ist (Goldfeder et al., 2013). Wie sich herausstellte, ist dieses Wassermolekül für viele Typ 3-Kupferproteine konserviert. Die Autoren schlugen vor, dass dieses Wassermolekül durch die Bindung an die beiden beschriebenen Aminosäuren Glutamat und Asparagin aktiviert werden könnte, wodurch monophenolische Substrate deprotoniert werden. Dieser Schritt ist entscheidend für die Ausprägung der Monophenolase-Aktivität (Rolff et al., 2011). Bei Vergleich der in dieser Arbeit ermittelten Sequenzdaten zeigte sich, dass das Asparagin für L-VvPPOcs-2 (N240) konserviert, jedoch bei L-VvPPOcs-3 durch ein Glycin (G241) ersetzt ist. Während L-VvPPOcs-2 Monophenole umsetzt, konnte bei L-VvPPOcs-3 lediglich die Diphenolase-Aktivität eindeutig gezeigt werden (siehe Kapitel 1.1.3). Mittels ortsgerichteter Mutagenese sollte deshalb das entsprechende Glycin (G241) bei L-VvPPOcs-3 gegen ein Asparagin ausgetauscht werden (G241N). Dies müsste eine deutliche Monophenolase-Aktivität zur Folge haben, falls die oben genannte Hypothese zutrifft.

Eine weitere strukturelle Auffälligkeit zeigt sich, bei Vergleich der Kristallstrukturen pflanzlicher PPOs, mit den Strukturen der Tyrosinasen von Pilzen (siehe Abb. 21). Während bei letztgenannten, sowohl die beiden Wasser-bindenden Elemente (Glutamat und Asparagin), als auch die Kupferkoordinierenden Histidine H_{B1} und H_{B2}, auf einer durchgehenden Helix (Helix 10) platziert sind, weisen viele pflanzliche PPOs auf Position H_{B1}-1 eine Prolin-Insertion auf. Dies führt in den Strukturen von *IbCO-1* (1BT3), *VvPPOg* (2P3X) und *JrPPO* (5CE9, nicht gezeigt) zu einer Teildeformation bzw. Teilauflösung der erwähnten Helix (Helix 11). Zusätzlich besitzt L-VvPPOcs-3 ein weiteres Prolin auf Position H_{B1}+2, welches zusammen mit G241 die Integrität von Helix 11 stören könnte. Um potentielle Prolin- bzw. Glycin – induzierte Helix-störende Effekte an der Cu-B Bindungsstelle zu eliminieren, wurden daher die beiden weiteren G241N/P242I- und P239del/G241N/P242I-Muteine erzeugt.

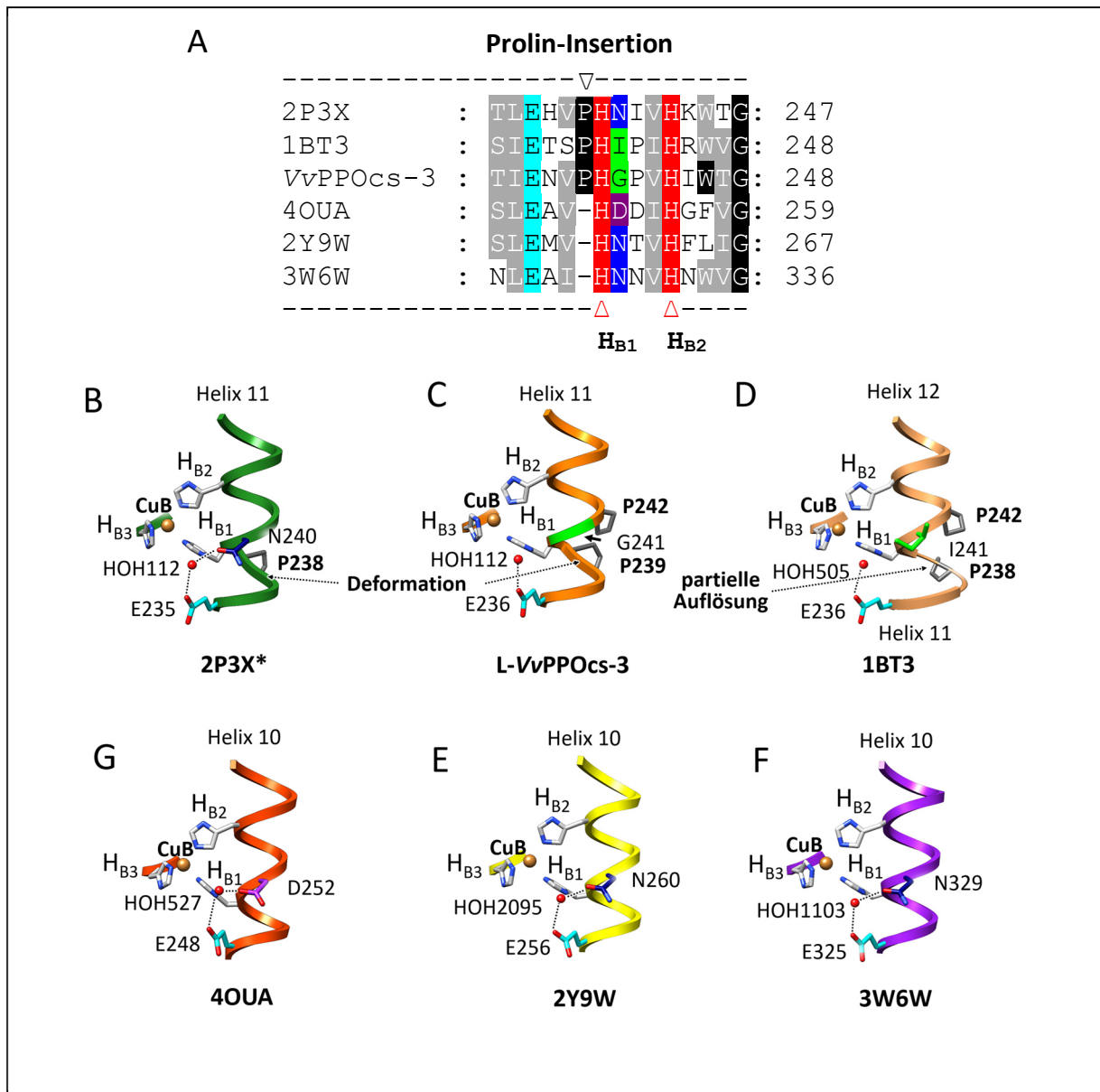


Abb. 21: Vergleich der Cu-B Bindungsstellen pflanzlicher PPOs mit ausgewählten Tyrosinasen aus Pilzen. (A) Struktur-basiertes Alignment der Primärstrukturen von pflanzlichen PPOs (2P3X, VvPPOcs-3 und 1BT3) und Tyrosinasen von Pilzen aus *A. bisporus* (4OUA, 2Y9W) sowie *A. oryzae* (3W6W). Wie deutlich zu erkennen ist, besitzen pflanzliche PPOs stromaufwärts von H_{B1} eine Prolin-Insertion [s. auch Abb. 13 (B)]. Die Pyrrolidinringe (violett) der entsprechenden Proline, scheinen hierbei die Integrität der Helices (Helices 11) zu stören. Dies äußert sich in den jeweiligen Strukturen (B und D) bzw. im Homologiemodell (C) von L-VvPPOcs-3 durch eine Teildeformation bzw. Teilauflösung (1BT3) der Helix 11. Bei den Tyrosinasen der Pilze hingegen (E-F) sind die Strukturelemente H_{B1} und H_{B2} sowie die Wasser-bindende Glutaminsäure (cyan) und das Asparagin (dunkelbau) bzw. Asparaginsäure (violett) auf einer durchgehenden Helix (Helix 10) lokalisiert.

3.1 Ortsgerichtete Mutagenese: Herstellung dreier Muteine

Die Generierung der Mutein-Konstrukte G241N, G241N/P242I, sowie P239del/G241N/P242I erfolgte mit Hilfe des *In-Fusion™ HD cloning Kits* (Clontech-Takara Bio Europe) nach Angaben des Herstellers.

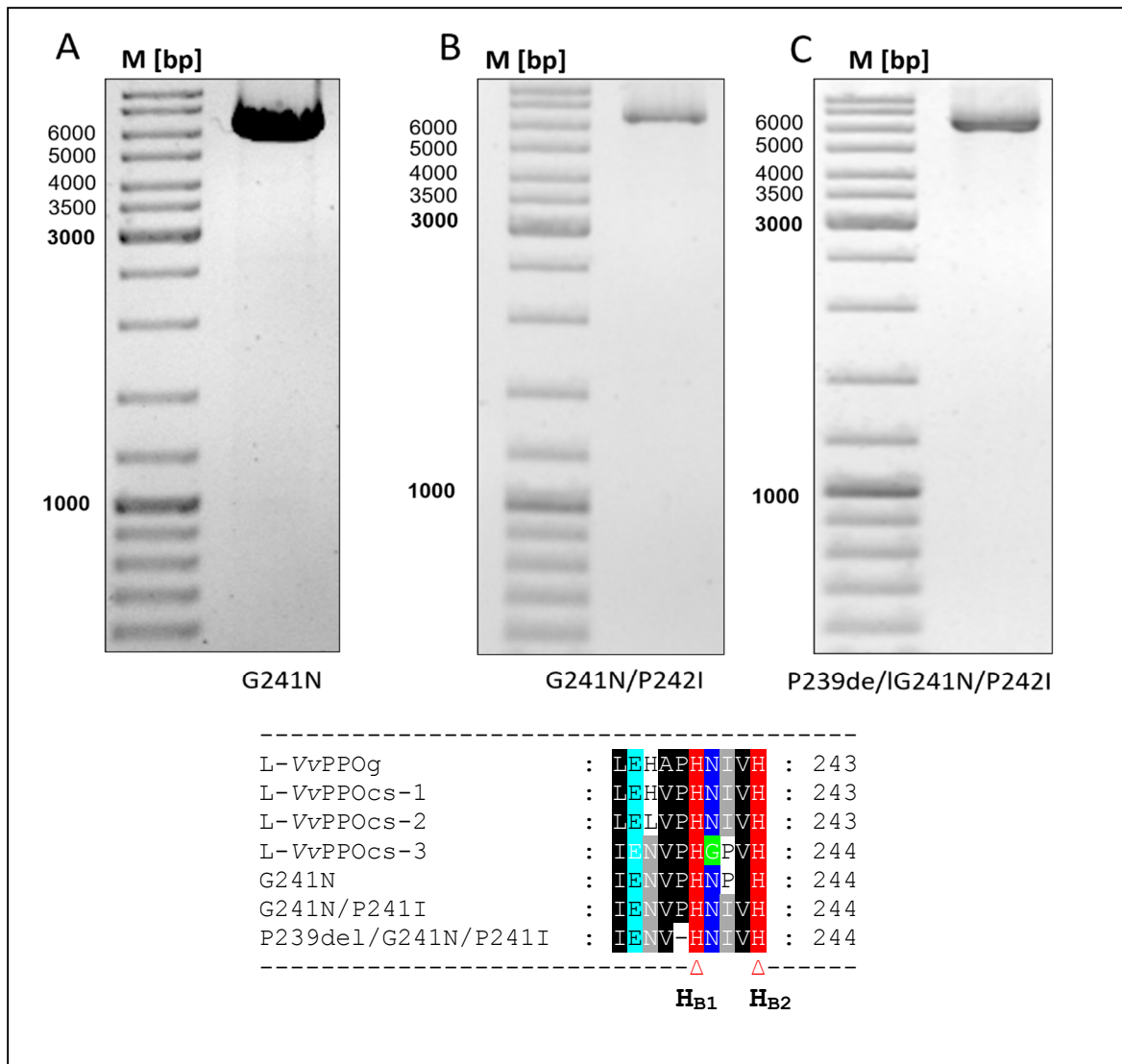


Abb. 22: Übersicht über die erstellten G241N, G241N/P242I und P239del/G241N/P242I-Konstrukte. (A) – (C) 0,9 %ige Agarosegele der elektrophoretisch getrennten, linearisierten PCR-Produkte (nach 27 Zyklen). Mit spezifischen Längen von ca. 6700 bp stimmen die erzeugten Amplifikate, mit den erwarteten Längen von 6731 bp [(A) G241N und (B) G241N/P242I] bzw. 6728 bp [(C), P239del/G241N/P242I] überein. (D) Aliniertes Teilabschnitt der Cu-B Bindungsstelle aus der L-VvPPOg-Referenzstruktur sowie der drei L-VvPPOcs-Isoformen und der generierten Muteine. Anhand des Alignments ist zu erkennen, dass das Asparagin (N240, rot) für L-VvPPOg bzw. L-VvPPOcs-1 konserviert und in der L-VvPPOcs-3-Isoform durch ein Glycin (G241, blau) substituiert ist. Die kodierende Sequenz wurde für die Generierung der drei Mutein-Konstrukte in ein Asparagin mutiert. Um L-VvPPOg und L-VvPPOcs-2 strukturell möglichst nahe zu kommen, wurde das Prolin in Position 242 zusätzlich durch ein Isoleucin substituiert. Als dritte Variante wurde das für pflanzliche PPOs charakteristische und konservierte Prolin in Position 239 deletiert. [Verwendeter Marker: GeneRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte)]

Die Substitutionen bzw. die Deletion, welche für die Generierung der Einzel- und Mehrfachmutanten erforderlich waren, wurden mittels inverser PCR unter Verwendung einer *KOD* DNA - Polymerase (Merck Millipore, Darmstadt) und mutagenen Primern (siehe Anhang G 2.) induziert. Hierfür wurden die mutagenen Triplets innerhalb einer 15 bp Homologie an den 5'-Enden der genspezifischen Primer inkorporiert. Als Matrize für die inverse PCR diente das L-VvPPOcs-3-pET-51b(+) Wildtyp-Konstrukt. Die generierten PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (siehe Abb. 22). Nach erfolgter Überprüfung wurden die parentalen L-VvPPOcs-3-pET-51b(+) Wildtyp-

Matrize mit Hilfe eines *DpnI*-Verdau selektiv abgebaut. Für die Rezirkularisierung der PCR-Produkte diente der *In-Fusion™ Enzyme Premix* der Firma Clontech-Takara (Bio Europe). Die auf diese Weise erhaltenen Vektoren wurden anschließend in chemisch kompetente *E. coli* Stellar™ *Competent Cells* (Clontech-Takara Bio Europe) transformiert. Nach Plasmidvermehrung und Isolierung erfolgte die Verifizierung der putativen Mutein-Konstrukte mittels DNA-Sequenzierung (StarSEQ, Mainz).

3.2 Rekombinante Expression der Muteine

Für die rekombinante Expression der Muteine in *E. coli* wurden die spezifischen Expressions-Konstrukte in Rosetta™ 2(DE3)pLysS (Novagen®, Merck-Millipore, Darmstadt) transformiert. Die Expression sowie die nachträgliche Aufreinigung des rekombinanten Proteins, erfolgte unter den in Kapitel 1.1.3 beschriebenen Bedingungen für den L-VvPPOcs-3 Wildtyp und wurde mittels SDS-PAGE verifiziert (siehe Abb. 23).

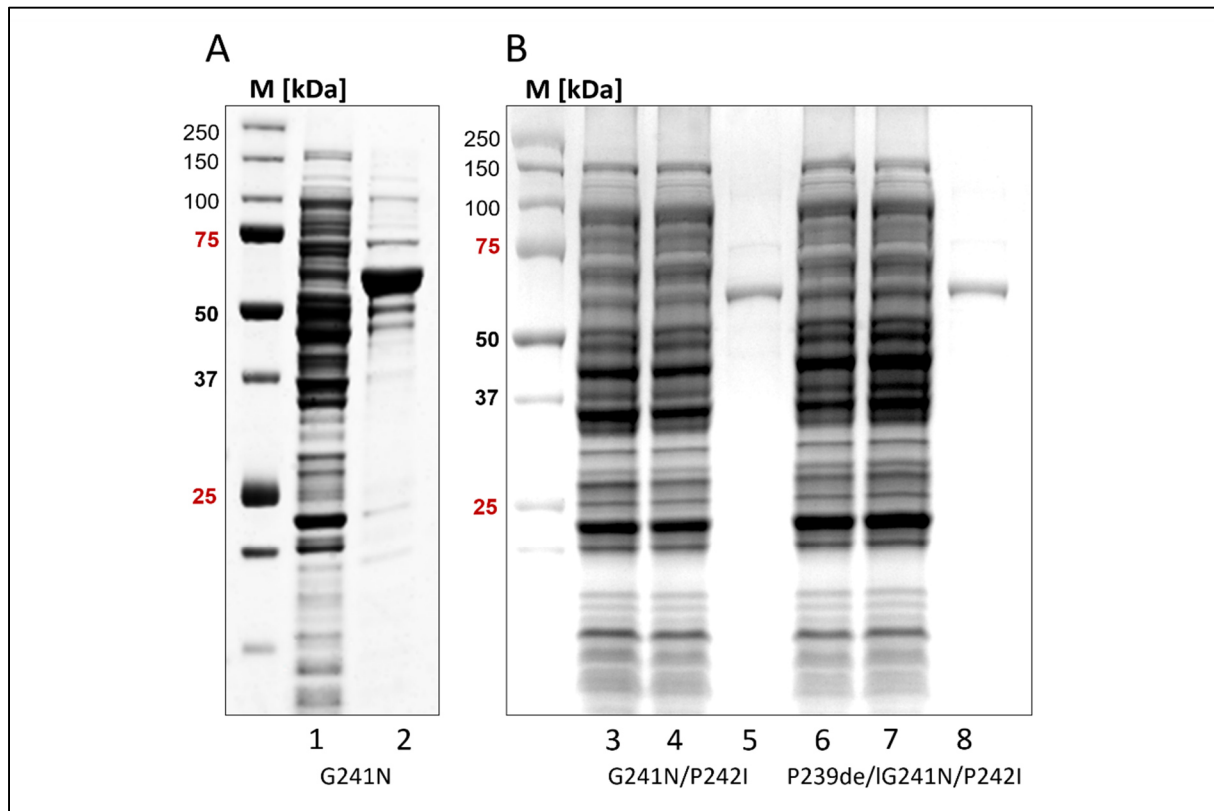


Abb. 23: Nachweis der rekombinant exprimierten Muteine (G241N, G241N/P242I und P239del/G241N/P242I) mittels SDS-PAGE. (A und B) SDS-PAGE (10 %) für den Nachweis der rekombinant erzeugten Muteine nach affinitätschromatographischer Reinigung. Spur 1, 3 und 6 zeigen jeweils die geklärten Lysate vor dem Säulendurchlauf. Spuren 2, 5 und 8 repräsentiert die aufgereinigten und mittels Ultrafiltration angereicherten Proteinproben. Anhand definierter Banden auf Höhe von ca. 60 kDa, ließen sich die rekombinanten Proteine in den drei Fraktionen (2, 5 und 8) eindeutig nachweisen. [Verwendeter Marker: PrecisionPlus™ Prestained Dual Color (BIO-RAD, München), Färbung: Coomassie-Brillant-Blau nach Kang et al. (2002)]

3.3 Nachweis und zeitlicher Zuwachs der Katalyse von Mono- und Diphenolen

Die Detektion der enzymatischen Aktivität des L-VvPPOcs-3-Wildtyps sowie der drei erzeugten rekombinanten Muteine (G241N, G241N/P242I und P239del/G241N/P242I) erfolgte qualitativ mit Hilfe eines biochemischen Assays in nativer PAGE und wurde analog zu den in Kapitel 1.3.4 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Für den Nachweis der Diphenolase-Aktivität wurde das Modells substrat 4-MC eingesetzt. Als Positivkontrolle diente die Tyrosinase von *A. bisporus* AbTY (Sigma, Aldrich). Nach elektrophoretischer Trennung und Aktivierung mittels SDS, erfolgte die Inkubation der Gele in der Substratlösung (10 mM 4-MC). Hierbei zeigten die drei Muteine und AbTY schon nach unmittelbarem Transfer der Gele in die Substratlösung eindeutige Aktivitätsfärbungen (siehe Abb. 24). Nach ca. 5-10 min erschienen die übrigen Banden. Im direkten Vergleich zeigten alle drei Muteine höhere Aktivitäten als der entsprechende L-VvPPOcs-3-Wildtyp. Insbesondere für P239del/G241N/P242I ergaben sich sehr hohe Farbintensitäten (siehe Abb. 24).

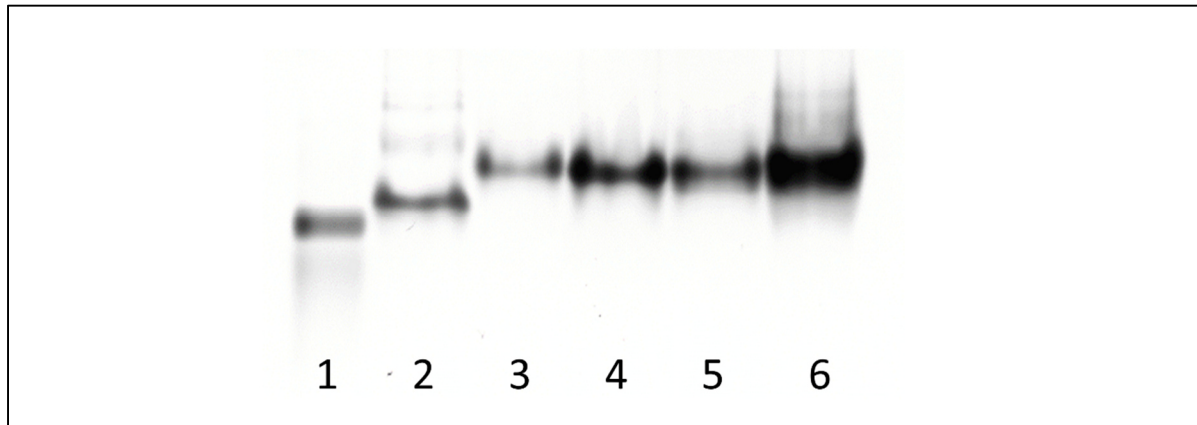


Abb. 24: Aktivitätsfärbung in nativer PAGE (10 %) nach Aktivierung mit SDS und Inkubation mit dem Diphenol 4-Methylcatchol. Die Konzentration des eingesetzten diphenolischen Substrats 4-MC betrug 10 mM. Als Positivkontrolle diente 5 µg AbTY (Spur 1). An rekombinantem Protein (L-VvPPOcs-2, Spur 2; L-VvPPOcs-3, Spur 3; G241N, Spur 4; G241N/P242I, Spur 5 und P239del/G241N/P242I, Spur 6) wurde jeweils 15 µg aufgetragen. Für die Aktivierung der Enzyme wurde 1,5 mM SDS in 100 mM Maleat-Tris, pH 5,5 eingesetzt. Das Gel wurde nach ca. 20 min Inkubation digitalisiert.

Der Nachweis der Monophenolase-Aktivität erfolgte unter Einsatz der Modells substrate *p*-Tyrosol und Tyramin. Um die Sensitivität des Assays zu erhöhen wurden die Substratlösungen mit äquimolaren Anteilen MBTH (3-Methyl-2-benzothiazolinon-hydrazonhydrochlorid) versetzt. Als Positivkontrolle diente hier ebenfalls AbTY. Nach elektrophoretischer Separation der Proteine und Aktivierung mittels SDS, wurden die Gele in den entsprechenden Substratlösungen inkubiert. Für einen Zeitraum von insgesamt 120 min erfolgte die Digitalisierung der Gele mit Hilfe eines ChemiDoc MP Imaging-Systems (BIO-RAD, München) in einem Zeitintervall von 5 min (siehe Abb. 25). Die Aktivitätsbanden wurden anschließend unter Verwendung des Programms ImageJ densitometrisch ausgewertet. Da sowohl AbTY als auch L-VvPPOcs-2 multiple Bandenmuster aufwiesen, wurde für die Auswertung jeweils die prominente Hauptbande verwendet. Anschließend wurden die erhaltenen integrierten

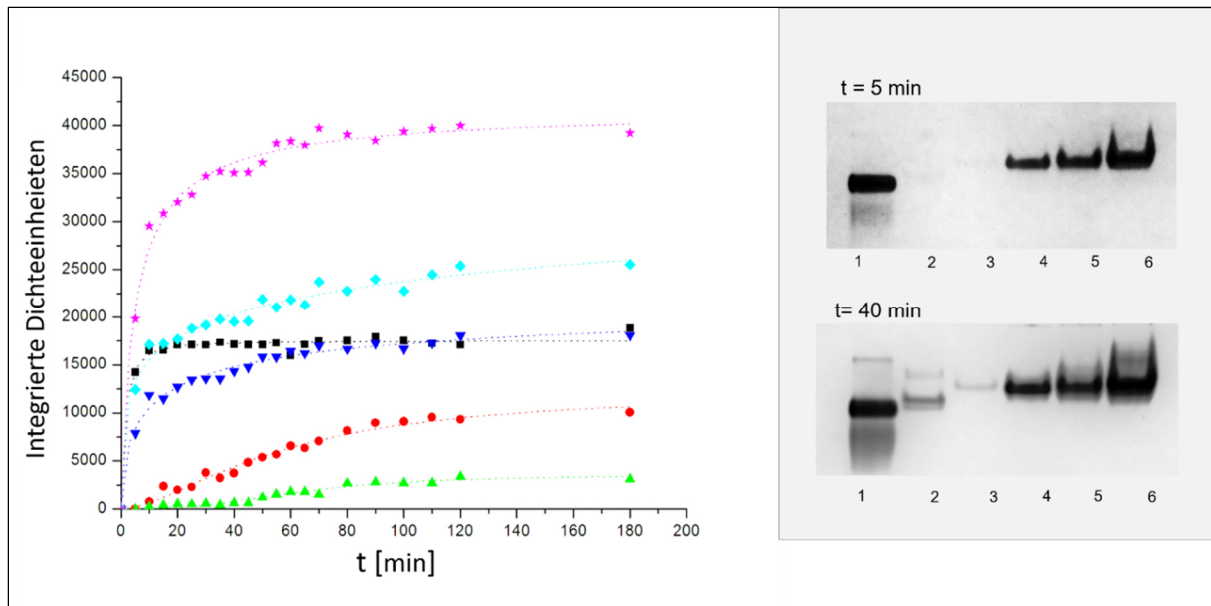


Abb. 25: Zeitliche Aktivitätsfärbung nach Aktivierung mittels SDS und Inkubation mit *p*-Tyrosol. Die Konzentration des eingesetzten *p*-Tyrosols betrug 6 mM. Um die Sensitivität des Assays zu erhöhen wurde die Substratlösung zusätzlich mit 6 mM MBTH versetzt. Als Positivkontrolle diente 5 μ g *AbTY*. An rekombinantem Protein, wurde jeweils 15 μ g aufgetragen. Das rechte Teilbild zeigt die Intensitätszunahmen der jeweiligen Aktivitätsbanden im zeitlichen Verlauf. Die entsprechenden integrierten Dichteinheiten wurden densitometrisch ermittelt (*AbTY*: schwarz, L-VvPPcs-2-Wildtyp: rot, L-VvPPcs-3-Wildtyp: grün, G241N: blau, G241N/P242: cyan, P239del/G241N/P242I: pink). Hier zeigt das P239del/G241N/P242I-Mutein mit Abstand die höchste Aktivität. Exemplarisch zeigen die beiden rechts dargestellten Gelbilder die Aktivitätsfärbung nach 5 min (oben) und 40 min (unten) Inkubation (*AbTY*: Spur 1, L-VvPPocs-2: Spur 2, L-VvPPocs-3: Spur 3, G241N: Spur 4, G241N/P242I: Spur 5 und P239del/G241N/P242I: Spur 6), native PAGE (10 %), RT.

Dichteinheiten in Abhängigkeit von der Zeit graphisch aufgetragen, und die Kurven mittels nichtlinearer Regression unter Verwendung der Hill-Funktion angepasst.

Für die drei Muteine ergaben sich bei Einsatz des Substrats *p*-Tyrosol starke Aktivitätsfärbungen. Diese waren bereits innerhalb der ersten Minute nach dem Transfer der Gele in die Substratlösungen deutlich zu erkennen und erschienen etwa zeitgleich mit den Aktivitätsbanden von *AbTY* (siehe Abb. 26). Ähnlich wie bereits für den Umsatz des Diphenols 4-MC geschildert, zeigte auch hier das P239del/G241N/P242I-Mutein die höchste Aktivität. Nach weiteren 10 min war der L-VvPPocs-2-Wildtyp und nach 15 min der L-VvPPocs-3 –Wildtyp durch deutlich schwächere Aktivitätsbanden charakterisiert. Letztgenannter blieb aber im Verhältnis zu den Muteinen und dem L-VvPPocs-2-Wildtyp auch nach 40 min deutlich schwächer ausgeprägt. Bei Umsatz des Monophenols Tyramin zeigte sich zunächst *AbTY* mit prominenter Bande, gefolgt von den beiden Muteinen G241N und G241N/P242I nach einer lag-Phase von ca. 15 min (siehe Abb. 26). Bei dieser Versuchsreihe zeigten sowohl die beiden Wildtyp-Formen, als auch das P239del/G241N/P242I-Mutein nur äußerst geringe Aktivitäten auf, welche erst nach einer Inkubation von 24 h merklich sichtbar wurden.

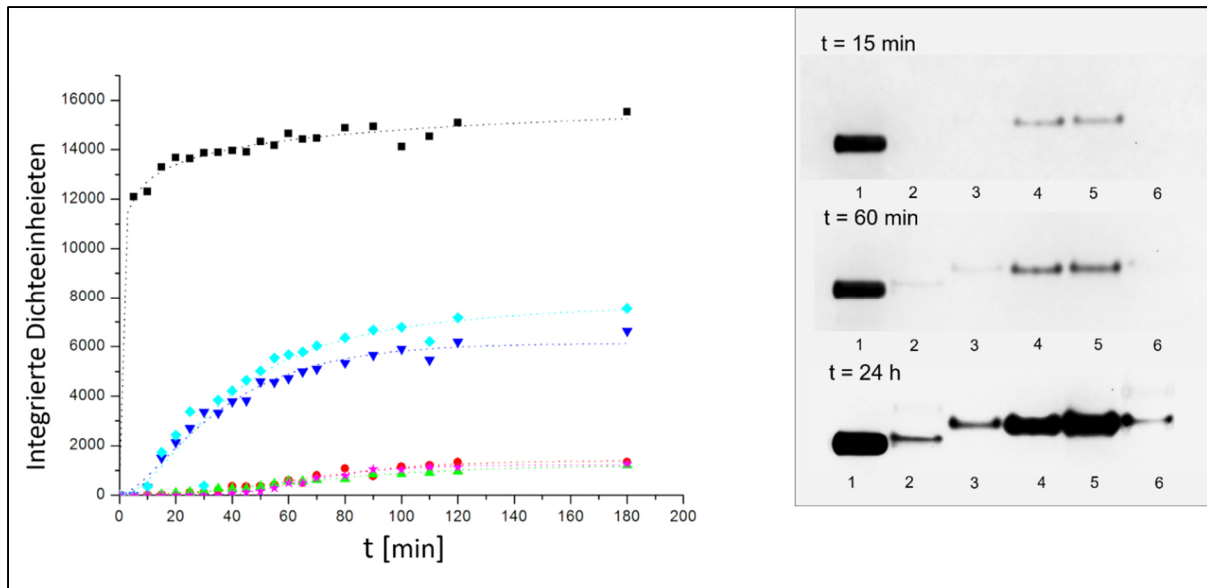


Abb. 26: Zeitliche Aktivitätsfärbung nach Aktivierung mittels SDS und Inkubation mit Tyramin. Die Konzentration des eingesetzten Tyramins betrug 6 mM. Um die Sensitivität des Assays zu erhöhen, wurde die Substratlösung zusätzlich mit 6 mM MBTH versetzt. Als Positivkontrolle diente 5 μ g AbTy. An rekombinantem Protein wurde jeweils 15 μ g aufgetragen. Das linke Teilbild zeigt die Intensitätszunahmen der jeweiligen Aktivitätsbanden im zeitlichen Verlauf (AbTY: schwarz, L-VvPPcs-2-Wildtyp: rot, L-VvPPcs-3-Wildtyp: grün, G241N: blau, G241N/P242: cyan, P239del/G241N/P242I: pink). Die drei rechts aufgeführten Teilbilder repräsentieren die Aktivitätsfärbung nach 15 min (oben), 60 min (Mitte) und 24 h (unten) Inkubation in der Substratlösung (AbTY: Spur 1, L-VvPPcs-2: Spur 2, L-VvPPcs-3: Spur 3, G241N: Spur 4, G241N/P242I: Spur 5 und P239del/G241N/P242I: Spur 6), native PAGE (10 %), RT.

D Diskussion

1. Rekombinante Expression einer latenten pflanzlichen PPO mit ausgeprägter Monophenolase-Aktivität

Eine große Herausforderung in dieser Arbeit stellte die Etablierung eines zuverlässigen Expressionssystems für PPOs aus *V. vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon in *E. coli* dar. Berichte über erfolgreiche heterologe Expressionen von pflanzlichen PPOs in *E. coli*, insbesondere in nativer Form, waren in der Vergangenheit selten. Hier beschränken sich die Berichte über erfolgreiche Expressionsversuche von pflanzlichen PPOs in *E. coli* auf Sullivan et al. (2004) Wu et al. (2010), und Liu et al. (2010). Letztgenannten gelang es zwar eine heterolog exprimierte PPO aus der Teepflanze (*C. sinensis*) zu gewinnen, jedoch in nativer Form lediglich in äußerst geringen Mengen. Ein Großteil befand sich als Einschlusskörper in der unlöslichen Fraktion. Zwar konnten diese Proteine unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und einer erfolgreichen Rückfaltung unterzogen werden, aber die erzielten enzymatischen Aktivitäten der rekombinanten Proteine waren wesentlich geringer, als die der biochemisch gewonnenen Formen aus dem Rohextrakt der Teepflanze (Lui et al., 2010). Ähnliches berichten Sullivan et al. (2004) und Wu et al. (2010). Beide Autoren wiesen darauf hin, dass nur ein Bruchteil des erzeugten rekombinanten Proteins nativ und voll funktionsfähig war. Hier befand sich der Hauptproteinanteil in der unlöslichen Fraktion. Als mögliche Erklärung hierfür wurde die Präsenz von Disulfidbrücken in pflanzlichen PPOs genannt. Diese sind für viele PPOs hoch konserviert und könnten in prokaryotischen Expressionssystemen wie *E. coli* ein mögliches Problem darstellen. In diesem Zusammenhang wurde diskutiert, dass ein optimiertes Expressionssystem, was die Ausbildung von Disulfidbrücken fördert, ein möglicher Ansatzpunkt für die erfolgreiche Expression größerer Mengen an nativen, enzymatisch aktiven PPOs sein könnte (Sullivan et al., 2004).

Ein Durchbruch bei der heterologen rekombinanten Expression von pflanzlichen PPOs in *E. coli* wurde von Dirks-Hofmeister et al. (2012) erzielt. Hier war es erstmals möglich, latente PPOs aus *T. officinale* in löslicher Form sowie in hoher Quantität und Reinheit zu gewinnen (Dirks-Hofmeister et al., 2012, Dirks-Hofmeister 2013). Die Autoren berichteten, dass die zusätzliche Anreicherung des verwendeten Autoinduktionsmediums mit CuCl_2 (bis 2 mM) und milde Expressionsbedingungen bei niedrigen Temperaturen (26°C) wichtige Kriterien für die Produktion größerer Mengen nativer, enzymatisch aktiver PPOs sein könnten (Dirks-Hofmeister 2013).

Eine weitere erfolgreiche Expressionsstudie einer latenten PPO auf Basis einer Aureusidin Synthase (*CgAUS1*) aus *C. grandiflora* wurde kürzlich von Kaintz et al. (2014) vorgestellt. Hier konnte die rekombinante *CgAUS1* unter Einsatz von 1 mM CuCl_2 auch bei 37°C erzeugt und für

Kristallisationsversuche sowie für enzymatische Tests genutzt werden (Kaintz et al., 2014, Molitor et al., 2016).

In der vorliegenden Arbeit wurden für die Expression spezifischer funktioneller Teilbereiche von PPO-Isoformen aus *V. vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon zwei verschiedene Expressionsvektoren [pTrcHis und pET51b(+)] genutzt (siehe Kapitel C 1.3.2 und C 1.3.3). Zudem kamen zwei unterschiedliche Affinitäts-Tags [6x His- und Strep II-Tag] zum Einsatz. Die katalytische N-terminale Domäne von VvPPOcs-1 konnte zwar unter Einsatz von 25 μM CuCl_2 in löslicher Form rekombinant gewonnen werden, jedoch zeigte das aufgereinigte Protein keine eindeutige Katalyse für den Umsatz von Dopamin. Ein möglicher Grund für diese Inaktivität, könnte an einer unzureichenden Menge des eingesetzten CuCl_2 gelegen haben.

Mit freundlicher Unterstützung durch [REDACTED] (Universität, Münster) gelang es schließlich, ein vergleichbares, zuverlässiges Expressionssystem für L-VvPPOcs-2 zu etablieren. Die entsprechenden Expressionsbedingungen konnten nachträglich nochmals optimiert werden und erfolgten für die Produktion von L-VvPPOcs-2 und L-VvPPOcs-3 sowie der entsprechenden Muteine unter Zusatz von 250-300 μM CuCl_2 bei 24-26°C für 48 h. Unter diesen Bedingungen konnten große Mengen voll funktionsfähiger rekombinanter PPO-Isoformen und Muteine mit einer erzielten Reinheit von 90-95 % erzeugt werden. Zudem zeigten enzymatische Aktivitätstests zum ersten Mal eine eindeutige Monophenolase-Aktivität für eine rekombinant erzeugte PPO aus *Vitis vinifera*.

Im Rahmen dieser Arbeit war es zeitlich nicht möglich das VvPPOcs-1-Konstrukt nochmals unter den optimierten Bedingungen zu exprimieren.

2. Strukturelemente am aktiven Zentrum von Typ 3-Kupferproteinen welche die Katalyse beeinflussen

Tyrosinasen zeichnen sich dadurch aus, monophenolische Substrate katalytisch umzusetzen. Die homologen und strukturell verwandten Catecholoxidasen hingegen, vermitteln lediglich den Umsatz von Diphenolen. Die genauen strukturellen Ursachen, welche diese Restriktion verursachen, sind jedoch noch weitgehend unbekannt und stehen im Fokus aktueller Forschungsarbeiten (Goldfeder et al., 2013; Goldfeder et al., 2014; Kanteev et al., 2015)

In der Vergangenheit wurden pflanzliche PPOs als Catecholoxidasen beschrieben (Goldbeck und Cammarata, 1981; King und Flurkey, 1987; Robinson und Dry, 1987; Klabunde et al., 1998; Pérez-Gilabert und García Carmona, 2000; Kanade et al., 2006; Dirks-Hofmeister et al., 2012). Jedoch wurden mittlerweile einige Arbeiten veröffentlicht, die auch für prozessierte pflanzliche PPOs, Monophenolase-Aktivitäten zeigen konnten (Zekiri et al., 2014; Fronk et al., 2015). Kürzlich gelang es Fronk et al (2015) erstmalig eine biochemisch gereinigte, prozessierte PPO (ca. 38 kDa) aus *V. vinifera* L. cv. Riesling mit ausgeprägter Monophenolase-Aktivität zu charakterisieren. Dieses Resultat steht

jedoch im Kontrast zu dem, was durch Virador et al. (2010) für die PPO aus dem Cultivar Grenache publiziert wurde. Hiernach besaß die ebenfalls biochemisch gereinigte katalytische Einheit von VvPPOg ausschließlich Diphenolase-Aktivität. Der Grund für diesen offensichtlichen Widerspruch konnte in dieser Arbeit jedoch nicht geklärt werden.

Die Strukturelemente, welche bislang bei Typ 3-Kupferproteinen identifiziert werden konnten und potentiell die enzymatische Aktivität beeinflussen könnten, werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt und diskutiert.

2.1 Das *Gate-Residue*: Ein Kriterium für die Suppression der Monophenolase-Aktivität bei Catecholoxidasen?

Ein markantes strukturelles Merkmal pflanzlicher PPOs, welches Catecholoxidasen daran hindern könnte Monophenole umzusetzen, ist die Anwesenheit bestimmter konservierter Phenylalanine. In den Kristallstrukturen von *I. batatas* (*IbCO-1*, PDB-ID: 1BT3, F261) *V. vinifera* (*VvPPOg*, PDB-ID: 2P3X, F259) und *J. regia* (*JrTY*, PDB-ID: 5CE9, F260) besetzen diese identische topologische Positionen auf flexiblen Schleifen oberhalb der jeweiligen Zugänge zu den aktiven Zentren (Klabunde et al., 1998; Virador et al., 2010; Bijelic et al., 2015). Am Beispiel der *IbCO-1*-Struktur (PDB-ID: 1BUG) wurde im Zusammenhang mit einem kokristallisierten Inhibitor PTU (Phenylthiourea) diskutiert, dass das sperrige F261 den Zugang zum Dikupfer-Zentrum für bestimmte Substrate kontrollieren könnte (Klabunde et al., 1998; Eicken et al., 1999; Gerdemann et al., 2002a, Gerdemann et al., 2002b). Daher wurde das entsprechende Phenylalanin als *Gate-Residue* bezeichnet und die Vermutung geäußert, der Zugang zu CuA könnte für sperrige Substrate blockiert werden (Decker und Rimke, 1998; Eicken et al., 1999; Decker und Tuczec, 2000; Gerdemann et al., 2002a). Es gibt mittlerweile zahlreiche Hinweise darauf, dass die Bindung an CuA ein wichtiges Kriterium für die *ortho*-Hydroxylierung von Monophenolen ist (Decker und Tuczec, 2000; Decker et al., 2006; Matoba et al., 2006; Rolff et al., 2011, Goldfeder et al., 2014). Am Beispiel von Tyrosinasen aus dem Stamm der Mammalia wurde vorgeschlagen, dass Monophenole (L-Tyrosin) an CuA und Diphenole (L-) an CuB koordiniert werden (Olivares et al., 2002). Dies wäre u.a. eine mögliche Erklärung dafür, warum Catecholoxidasen mit sperrigen *Gate-Residues* zwar Diphenole, aber keine Monophenole umsetzen können. Mittels kokristallisierter Substrate konnte jedoch anhand der Kristallstrukturen zur Tyrosinase von *B. megaterium* (PDB-IDs: 4P6R, 4P6S, 4P6T) demonstriert werden, dass sowohl das Diphenol L-DOPA, als auch die beiden Monophenole Tyrosin und *p*-Tyrosol an die A-Seite koordiniert werden (Goldfeder et al., 2014). Um Tyrosinasen und Catecholoxidasen dennoch auf molekularer Ebene unterscheiden zu können, forderten Goldfeder et al. (2014) neben dem sperrigen Phenylring des *Gate-Residues*

zusätzlich eine stabilisierende Thioetherbrücke zu H_{A2}, einem der CuA-kordinierenden Histidine. Da vergleichbare Thioether in bakteriellen Tyrosinasen fehlen, sind die entsprechenden H_{A2}-Reste in den jeweiligen Strukturen flexibel (Matoba et al. 2006, Sendowsky et al., 2011, Goldfeder et al., 2013). Für pflanzliche PPOs könnte das über einen Thioether stabilisierte H_{A2} die Freiheitsgrade des *Gate-Residues* einschränken, wodurch eine Substratrotation am CuA-Zentrum sterisch gehindert wird (Goldfeder et al., 2014). LFMD-Simulationen zur Tyrosinase von *S. castaneoglobisporus* weisen darauf hin, dass das Substrat nach Koordination an CuA durch Rotation der Histidine (Berry-Pseudorotation) aus der axialen Lage (parallel zu H_{A3}) in die äquatoriale Lage wechselt (parallel zu H_{A2}) (Deeth und Diedrich, 2010). Durch diese Konfiguration kann ein elektrophiler Angriff des Peroxids auf die *ortho*-Position des Substrats erfolgen (van Gastel et al., 2000; Deeth und Diedrich, 2010). Dies ist aber nicht zwingend erforderlich, da die Peroxid-Gruppe durch die spezifischen Eigenschaften der Dikupfer(II)-Peroxo-Zentren von Typ 3-Kupferproteinen (hohe strukturelle Flexibilität und niedrige Symmetrie) frei rotieren kann (Decker et al., 2006; Rolff et al., 2011). Vermutlich ist die Rotation des Peroxids in diesem Fall lediglich durch eine leichte „Verkipfung“ des Substrats aus der axialen *trans*-Stellung zu H_{A3} in die äquatoriale Richtung begleitet (Decker und Tuczec, 2000; Decker et al., 2006). Auf diese Weise könnte ebenfalls ein adäquater elektrophiler Angriff des Peroxids ermöglicht werden (Decker et al., 2000). Durchgeführte MD-Simulationen anhand der Struktur von *VvPPOg* deuten darauf hin, dass F259 trotz des ebenfalls vorhandenen Thioethers flexibel ist und durch Rotation den Weg für sperrige Substrate (*p*-Cumarsäure) zum CuA-Ion freigeben kann (Fronk et al., 2015). Dieses Resultat zusammen mit dem experimentellen Nachweis einer distinkten Monophenolase-Aktivität für spezifische PPOs aus *V. vinifera* liefert einen sicheren Hinweis dafür, dass die Präsenz eines sperrigen F259 in Verbindung mit einem stabilisierenden Thioether nicht ausreicht, Catecholoxidasen und Tyrosinasen auf molekularer Ebene zu unterscheiden.

Für pflanzliche PPOs konnte neben den konservierten Phenylalaninen ebenfalls Leucine an entsprechender Position identifiziert werden (Marusek et al., 2006). Mit Hilfe von Sequenzvergleichen, welche im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels Sequenzdaten pflanzlicher PPOs aus der Nukleotid-Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology Information) erstellt wurden, konnte eine weitere Gruppe mit Tyrosinen an Position des *Gate-Residues* eruiert werden (siehe Abb. 27, Gruppe 2). Die Kristallstrukturen der Tyrosinasen und Catecholoxidasen der Pilze *A. bisporus* (*AbPPO-3*, PDB-ID: 2Y9W; *AbPPO-4*, PDB-ID: 4OUA), *A. orycae* [*melB*, PDB-ID: 3W6W (*holo*-Protyrosinase) und 3W6Q (*apo*-Protyrosinase); *AoCO-4*, PDB-ID: 4J3R] sind durch Valine an Position des *Gate-Residues*, charakterisiert (siehe Abb. 28, B) (Ismaja et al., 2011; Fujieda et al., 2013; Hakulinen et al., 2013; Mauracher et al., 2014). Zudem weisen multiple Sequenzalignments auf Basis bestimmter Pilz-Tyrosinasen darauf hin, dass ebenfalls Leucine und Proline die jeweiligen potentiellen Stellen

einnehmen können (Marusek et al., 2006; Fujieda et al., 2013).

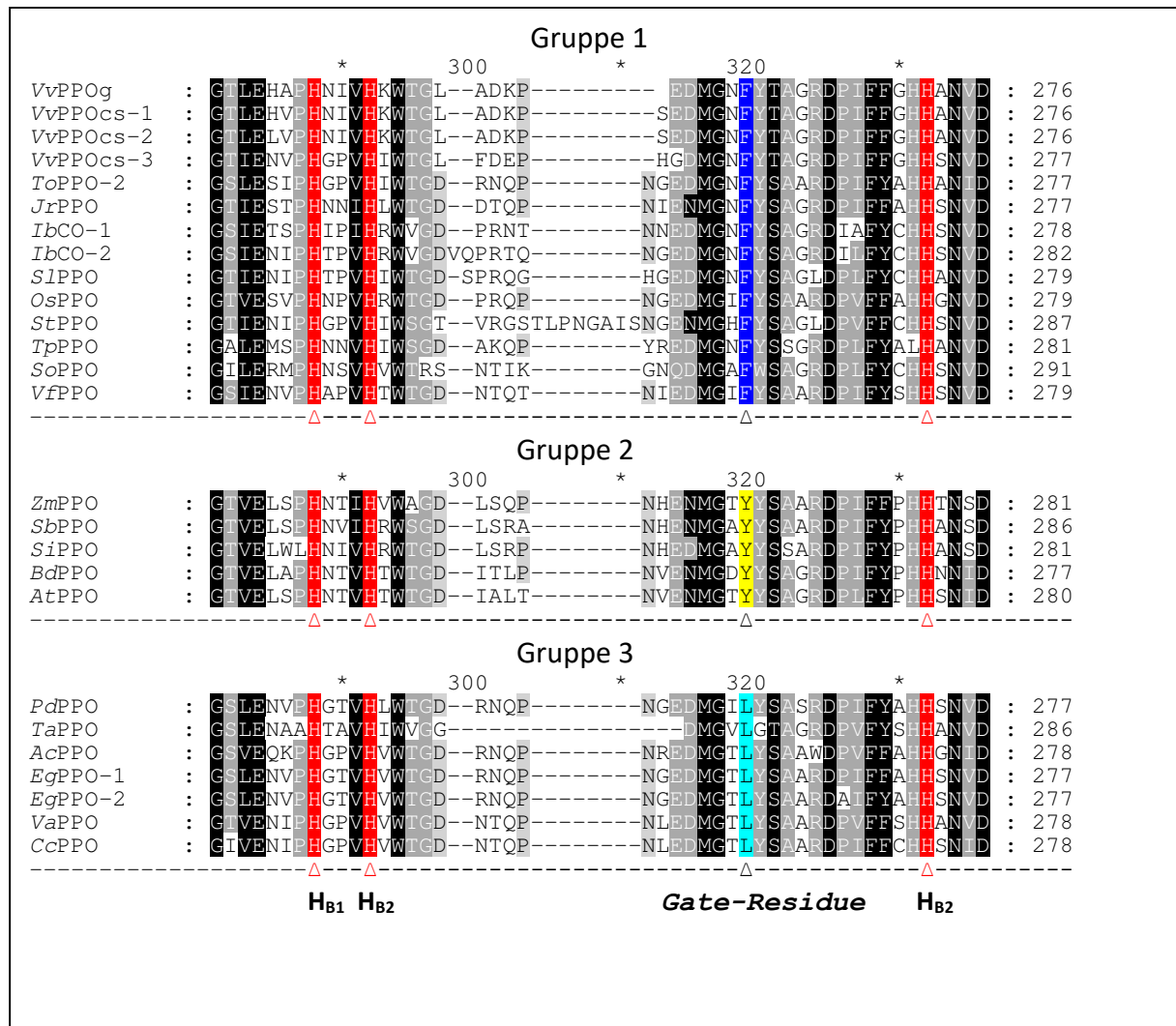


Abb. 27: Ausschnitt eines multiplen Sequenzalignments von CuB-Motiven ausgewählter pflanzlicher PPOs. Die Positionen sind dem Grad der Konservierung folgend schwarz bis hellgrau hinterlegt. Die drei CuB-koordinierenden Histidine (H_{B1}, H_{B2} und H_{B3}) sind rot markiert. Anhand des gezeigten Alignments lassen sich bezüglich des *Gate-Residues* drei Großgruppen definieren. Gruppe 1 mit Phenylalaninen (blau), Gruppe 2 mit Tyrosinen (gelb) und Gruppe 3 mit Leucinen (cyan). Die verwendeten Abkürzungen der PPOs werden im Anhang erläutert. Die Accession-Nummern zu den einzelnen Sequenzen sind im Anhang aufgeführt (siehe G 1.4, Tabelle 28).

Für bakterielle Tyrosinasen lassen sich die Positionen des *Gate-Residues* ebenfalls anhand gelöster Kristallstrukturen ableiten. Während für *B. megaterium* ein Valin (V218) charakteristisch ist, finden sich bei *S. castaneoglobisporus* und anderen Streptomyceten, Glycine (G204) auf identischer Position (Matoba et al., 2006; Sendowsky et al., 2011; Claus und Decker, 2000).

Um die Auswirkungen des *Gate-Residues* auf die katalytische Aktivität des rekombinanten L-VvPPOcs-2 untersuchen zu können, wurden ausgehend vom Wildtyp-Konstrukt mittels PCR-basierter ortsgerichteter Mutagenese drei Muteine (F259L, F259V und F259G) erstellt. Hierbei wurden Aminosäuresubstitutionen zu Resten mit geringeren raumfüllenden Eigenschaften gewählt. Das F259L-Mutein diente hierbei als Modell für pflanzliche PPOs, bei welchen Leucine die Positionen des *Gate-Residues* einnehmen (siehe Abb.27 und 28). Die beiden anderen generierten Muteine F259V und

F259G, leiten sich aus den entsprechenden analogen Positionen in den Kristallstrukturen der

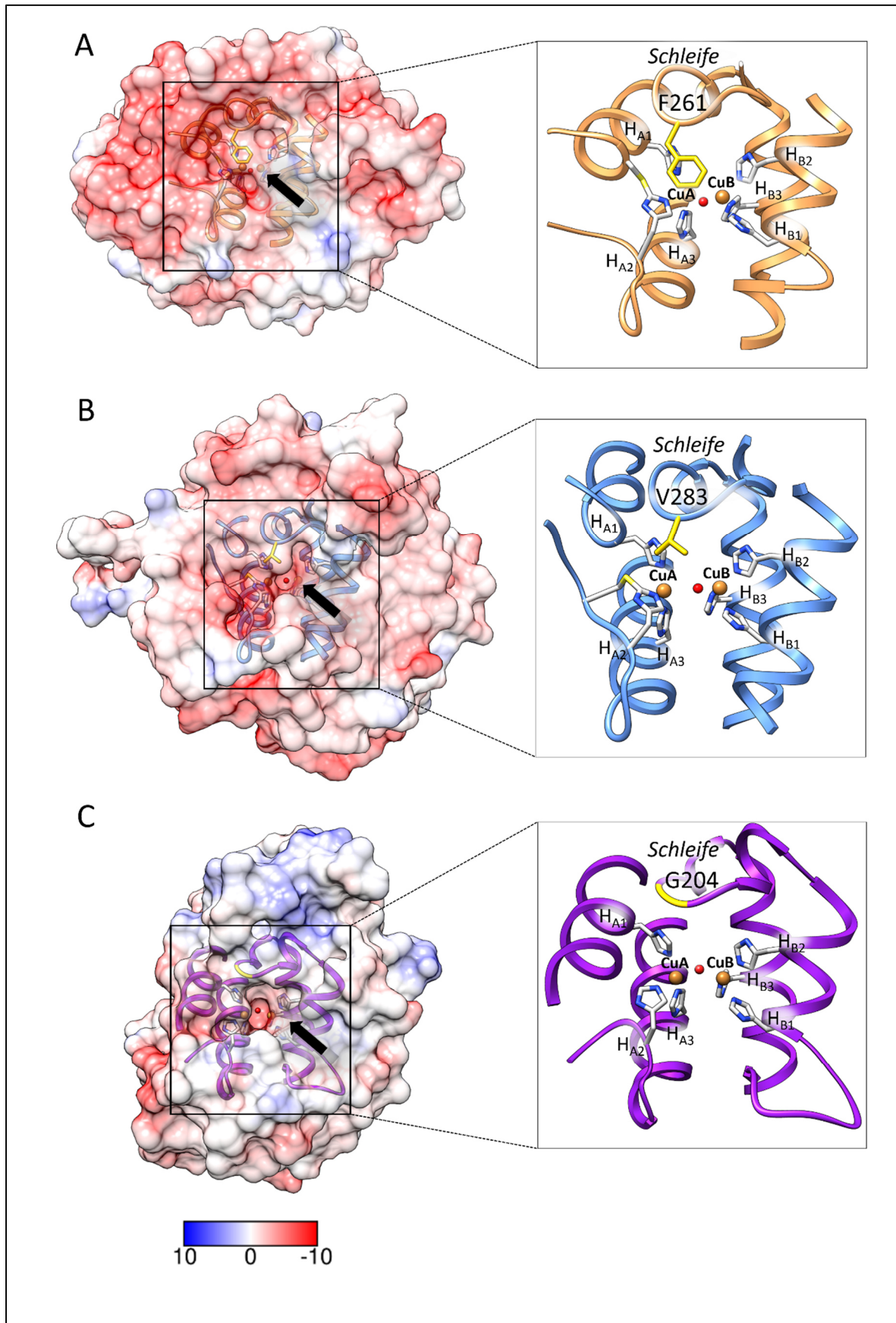


Abb.28: Lokalisation des Gate-Residues in unterschiedlichen Kristallstrukturen ausgewählter Typ 3-Kupferproteine. Die mittels UCSF Chimera generierten Coulomb-Ladungsverteilungen auf den Oberflächen der gezeigten Tertiärstrukturen sind

farbig dargestellt (blau=positive Ladungen, rot=negative Ladungen). Die schwarzen Pfeile weisen jeweils auf die Zugänge zu den aktiven Zentren. Zur besseren Veranschaulichung sind die zugehörigen „4- α -Helix-Bündel-Motive“ mit den entsprechenden Cu-Ionen (CuA und CuB) sowie der koordinierenden Histidine als Detailansicht im Bändermodell neben den Tertiärstrukturen aufgeführt. (A) Struktur der prozessierten IbCO-1 von *I. batatas* (PDB-ID: 1BT3). Hier positioniert sich das sperrige Phe261 auf einem flexiblen Loop oberhalb des Zugangs zum aktiven Zentrum. (B) Struktur des AbPPO-3 von *A. bisporus* (PDB-ID: 1Y9W) als Beispiel für eine Pilz-Tyrosinase mit einem Valin (Val283) in analoger Position. (C) Struktur des TYSc aus *S. castaneoglobisporus* mit einem Gly204 als Gate-Residue. Nur die beiden letzten Enzyme (B, C) besitzen Tyrosinase-Aktivität. Kupfer-Ionen sind beige und die Sauerstoffatome in met Koordination sind rot eingefärbt.

Tyrosinasen von Pilzen und Bakterien ab (Matoba et al., 2006; Sendowsky et al., 2011; Ismaya et al., 2011; Fujieda et al., 2013; Mauracher et al., 2014).

Für den Wildtyp konnte nach Aktivierung mit SDS und Umsatz der Diphenole Dopamin und 4-Methylcatechol sowie der Monophenole Tyramin und *p*-Cumarsäure, jeweils die höchsten Maximalumsatzgeschwindigkeiten (v_{max}) ermittelt werden (siehe Kapitel C 2.3). Die Muteine F259L, F259V und F259G hingegen zeigten deutlich niedrigere Aktivitäten oder waren gänzlich inaktiv für die eingesetzten Substrate (siehe Kapitel C 2.4). Bezüglich des Diphenols 4-Methylcatechol ergab sich für F259V der höchste v_{max} – Wert, gefolgt von F259L und F259G mit der geringsten Aktivität. Ähnliches zeigte sich für den Umsatz von Dopamin.

Bei Einsatz der Monophenole *p*-Cumarsäure und Tyramin konnten für F259G keine spezifischen Aktivitäten festgestellt werden, was die Vermutung nahe legt, dass dieses Mutein unter Voraussetzung einer vollständigen SDS-induzierten Aktivierung, keine Monophenolase-Aktivität besitzt. Ebenfalls konnte lediglich für F259V der Umsatz von Tyramin nachgewiesen werden. Hierbei war der ermittelte v_{max} – Wert signifikant niedriger als für F259L (siehe Kapitel C 2.4).

Im Allgemeinen ließ sich Anhand des enzymatischen Umsatzes von Tyramin für die Monophenolase-Aktivität des L-VvPPOcs-2-Wildtyps und der drei Muteine der Trend feststellen, dass mit abnehmenden raumfüllenden Eigenschaften der Aminosäurereste auf Position des *Gate-Residues* die ermittelten v_{max} – Werte sanken. Somit trat genau der gegenteilige Effekt ein, der im Vorfeld erwartet wurde. Mittels CD-spektroskopischer Analysen konnte bei Abgleich der Spektren mit dem L-VvPPOcs-2-Wildtyp für die drei Muteine kein Hinweis auf Faltungsunterschiede festgestellt werden (siehe Kapitel C 2.5). Dies ist ein Hinweis darauf, dass die beobachteten Unterschiede beim Umsatz der spezifischen Substrate nicht durch fehlgefaltete Enzyme induziert wurden.

Eine ähnliche Mutagenese-Studie am *Gate-Residue* wurde auf Grundlage der Tyrosinase TYBm aus *B. megaterium* erstellt (Goldfeder et al., 2013). Hier wurde das entsprechende V218 gegen Glycin (V218G) und Phenylalanin (V218F) ausgetauscht. Für die V218G-Variante konnte bei Umsatz des Monophenols Tyrosin sowie des Diphenols L-DOPA eine signifikante Erhöhung der Aktivitäten festgestellt werden. Mittels einer gelösten Kristallstruktur des V218G-Muteins wurde demonstriert, dass der Zugang zu CuA optimiert und gleichzeitig das Volumen des Reaktionsraums innerhalb der katalytischen Tasche erhöht war, was die verbesserten enzymatischen Eigenschaften des Muteins gegenüber dem Wildtyp erklärt (Goldfeder et al., 2013). Des Weiteren wurde berichtet, dass für das

V218F-Mutein bei Umsatz von Tyrosin ebenfalls ein erheblicher Anstieg der Monophenolase-Aktivität beobachtet wurde. Hier zeigte das Mutein ein 9-fach höheres Monophenolase/Diphenolase – Verhältnis als der Wildtyp. Goldfeder und Kollegen begründeten dieses überraschende Ergebnis, mit Hilfe einer ebenfalls gelösten Kristallstruktur des V218F-Muteins. Hier nimmt das flexible H_{B2} (H60) zwei alternative Lagen ein. In einer sogenannten *flipped-out* Konformation, in welcher H_{B2} durch eine der beiden genannten Lagen in Wechselwirkung mit dem mutierten F218 tritt, wird der Zugang zu CuA durch Verlagerung des Phenylrests freigelegt. Diese spezifische Konformation könnte die Koordination für Monophenole an das aktive Zentrum begünstigen (Goldfeder et al., 2013). Eine vergleichbare *flipped-out* Konformation kann jedoch für L-VvPPOcs-2 aufgrund des stabilisierenden Thioethers ausgeschlossen werden. Dennoch ist bei Umsatz von Tyramin für die Aktivität des L-VvPPOcs-2-Wildtyps (vergleichbar mit V218F) mit einem sperrigen F259 im Vergleich zu den ermittelten Daten des F259V-Muteins (vergleichbar mit *TYBm*-Wildtyp), ebenfalls eine Tendenz zu einer verbesserten Monophenolase-Aktivität zu erkennen. Die Ergebnisse zu F259G (keine detektierbare Monophenolase-Aktivität) stehen jedoch im direkten Widerspruch zur erhöhten Monophenolase-Aktivität des V218G-Muteins aus *B. megaterium*. Der Grund für diesen offensichtlichen Unterschied konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Da es auch denkbar ist, dass eine unvollständige SDS-induzierte Aktivierung der Muteine stattfand, sind weitere Experimente zur spezifischen Aktivierung der jeweiligen Enzyme erforderlich.

2.2 Thioether eine strukturelle Besonderheit von Typ 3-Kupferproteinen

Der Sequenzvergleich unterschiedlicher Typ 3-Kupferproteine in Kombination mit einem strukturellen Abgleich 3D-rekonstruierter Kristallstrukturen weisen darauf hin, dass das CuB-Motiv im Bereich der drei charakteristischen Kupfer-koordinierenden Histidine (H_{B1}, H_{B2} und H_{B3}) bei Hämocyaninen, Tyrosinasen und Catecholoxidasen weitgehend konserviert ist. Für das CuA-Motiv hingegen, ergeben sich in unmittelbarer Nähe zu den koordinierenden Histidinen oftmals erhebliche Unterschiede in der Aminosäureabfolge (van Gelder et al., 1997; Gerdemann et al. 2002b). Dass diese Heterogenität auch auf die Proteinfaltung Einfluss haben kann, konnte auf Basis vieler 3D-rekonstruierter Kristallstrukturen demonstriert werden (Cuff et al., 1998; Klabunde et al., 1998; Ismaya et al., 2011; Fujieda et al., 2013; Mauracher et al., 2014). Im Allgemeinen sind die katalytischen Zentren von Typ 3-Kupferproteinen durch konservierte „4- α -Helix-Bündel-Motive“ charakterisiert, in welche die beiden Kupfer-Ionen CuA und CuB eingebettet sind. Bei den Hämocyaninen und Prophenoloxidasen (pPO) der Arthropoden werden die Kupfer-koordinierenden Histidine der beiden Kupfer-Motive (CuA und CuB) von jeweils zwei starren, antiparallelen α -Helices bereitgestellt, wodurch der Dikupferkomplex stabilisiert wird (Gaykema et al., 1984; Volbeda und Hol, 1989; Magnus et al., 1994; Hazes et al., 1993; Magnus et al., 1994; Li et al., 2009; Masuda et al., 2014; Hu et al., 2016).

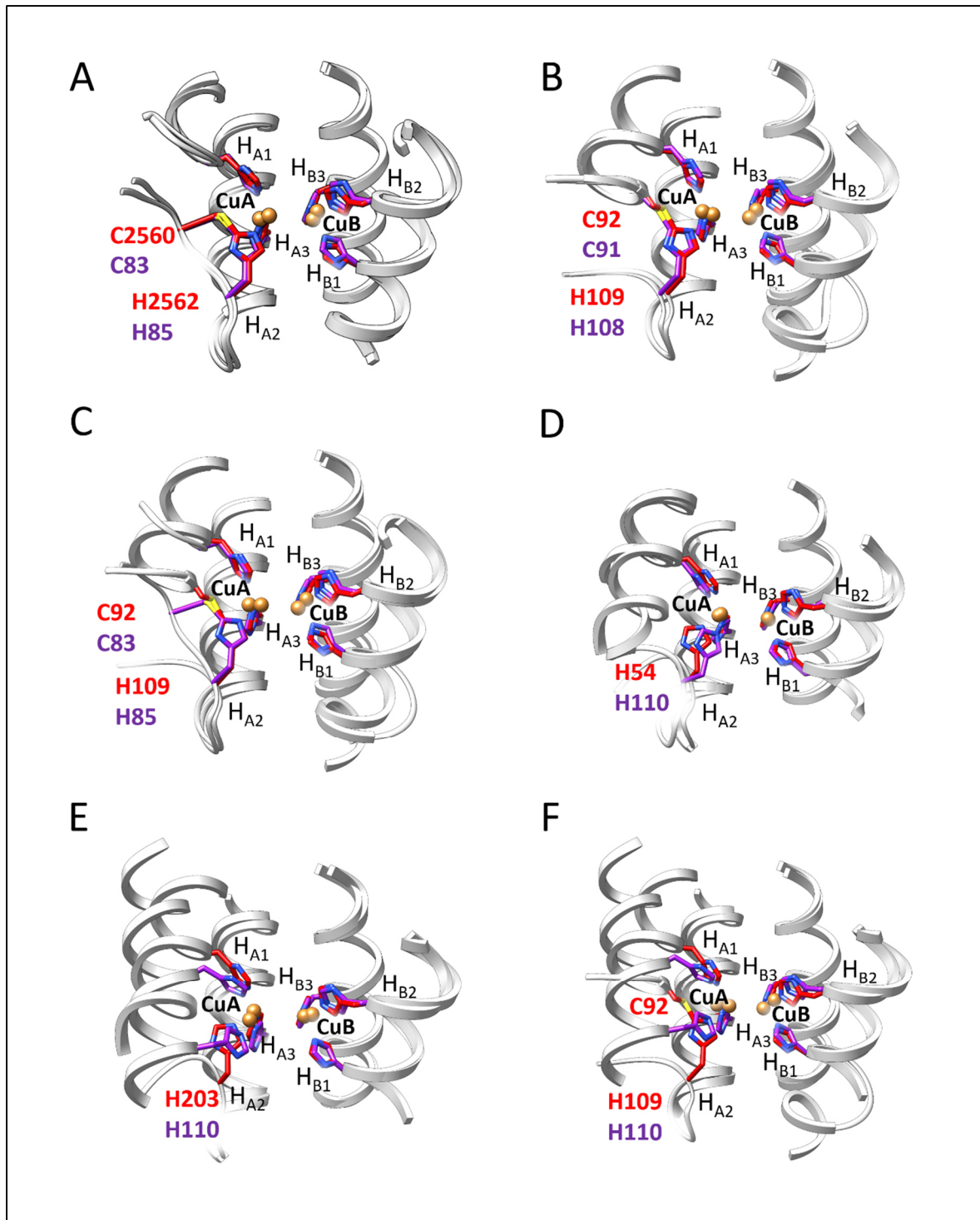


Abb. 29: Paarweiser struktureller Abgleich der „4- α -Helix-Bündel-Motive“ verschiedener Typ 3-Kupferproteine mit und ohne Thioetherbrücken im Bändermodell. Die Positionen von H_{A2} und den jeweiligen Cysteinen (C) sind in der angegebenen Farbcodierung der jeweiligen Strukturen angezeigt. (A) Superposition der „4- α -Helix-Bündel-Motive“ eines Hämocyanins von *O. dofleini* (PDB-ID: 1JS8, rot markierte Aminosäurereste) und *AbPPO-3* von *A. bisporus* (PDB-ID: 2Y9W, violett markierte Aminosäurereste) als Beispiel für Strukturen mit kurzen Thioether-Motiven ($-C-x-H_{A2}-$). (B) Superposition der Strukturen von *VvPPOg* von *V. vinifera* (PDB-ID: 2P3X, violett markierte Aminosäurereste) und *IbCO-1* von *I. batatas* (1BT3, rot markierte Aminosäurereste) als Beispiel für Strukturen mit langen Thioether-Motiven [$-C-x(15-20)-H_{A2}-$]. (C) Superposition von *AbPPO-3* (violett markierte Aminosäurereste) mit kurzem Thioether-Motiv und *IbCO-1* (rot markierte Aminosäurereste) mit langem Thioether-Motiv. (D) Superposition von *TYS* aus *S. castaneoglobisporus* (PDB-ID: 2ZMX, rot markierte Aminosäurereste) und *AoCO-4* aus *A. orycae* (PDB-ID: 4J3R, violett markierte Aminosäurereste) als Beispiel für Strukturen ohne Thioetherbrücken. (E) Superposition von *AoCO-4* (H_{A2} auf Loop, violett markierte Aminosäurereste) und der Prophenoloxidase *MspPO-2* von *M. sexta* (PDB-ID: 3WKY, Kette A), bei welcher H_{A2} (H203) auf einer α -Helix lokalisiert ist (rot markierte Aminosäurereste). Beide

Strukturen besitzen keine Thioetherbrücken. (F) Superposition von *lbCO-1* (rot markierte Aminosäurereste) und *AoCO-4* (violett markierte Aminosäurereste). Als Beispiel für Catecholoxidasen mit und ohne Thioetherbrücken.

Wie aus einer Vielzahl von Kristallstrukturen weiterer Typ 3-Kupferproteine hervorgeht, kann sich jedoch eines der drei Histidine (H_{A2}) des CuA-Motivs auch auf einer flexiblen Schleife befinden. Dieses strukturelle Charakteristikum zeigt sich bei den Tyrosinasen der Bakterien, den Tyrosinasen und Catecholoxidasen der Pilze, den Hämocyaninen der Mollusken und den pflanzlichen PPOs (Cuff et al., 1998; Klabunde et al., 1998; Matoba et al., 2006; Ismaja et al., 2011; Virador et al., 2010; Gasparetti et al., 2010; Hakulinen et al., 2013). Mit Ausnahme der bakteriellen Tyrosinasen sowie der Catecholoxidasen der Pilze bildet H_{A2} eine kovalente Thioetherbrücke mit einem räumlich benachbarten Cystein aus (Cuff et al., 1998; Klabunde et al., 1998; Matoba et al., 2006; Virador et al., 2010; Ismaja et al., 2011; Sendowski et al., 2011; Hakulinen et al., 2013; Mauracher et al., 2014; Molitor et al., 2016).

Der Vergleich von Primärstrukturen mit den Kristallstrukturen verschiedener Typ 3-Kupferproteine, die sich durch die Präsenz dieser spezifischen Thioether auszeichnen, erlaubt eine Unterteilung in zwei Gruppen. Die erste Gruppe ist durch relativ kurze Motive gekennzeichnet. Hier befindet sich das Cystein an zweiter Positionen stromaufwärts von H_{A2} (H_{A2-2} , -C-x- H_{A2-}) und besetzt somit die identische flexible Schleife. Diese kurzen Motive finden sich bei den Hämocyaninen der Mollusken und bestimmten Tyrosinasen der Pilze (siehe Abb. 29, A). Die zweite Gruppe besitzt ein langes Motiv und beschränkt sich auf pflanzliche PPOs. Hier sind die spezifischen Cysteine auf Position $H_{A2-15-20}$ [-C-x(15-20)- H_{A2-}] starrer α -Helices lokalisiert (Abb. 29, B). Der strukturelle Abgleich von 3D-Strukturen pflanzlicher PPOs mit der Struktur eines Hämocyanins aus *O. dofleini* (PDB-ID: 1JS8) zeigt, dass sich beide Strukturen, insbesondere die Imidazolringe des H_{A2} , nahezu perfekt superpositionieren lassen (Abb. 29, C).

Die genaue Funktion dieser ungewöhnlichen Thioether ist noch weitgehend unbekannt und ist die Grundlage einiger Hypothesen. So wurde beispielsweise vorgeschlagen, dass durch den Thioether die Flexibilität von H_{A2} reduziert wird, wodurch die Koordination zum CuA-Ion stabilisiert werden könnte (Cuff et al., 1998; Klabunde et al., 1998). Zudem wurde vermutet, dass durch die Einschränkung der Flexibilität des H_{A2} -Rests u.a. die kritische *ortho*-Hydroxylierung von Monophenolen verhindert werden könnte. (Goldfeder et al., 2013; Goldfeder et al., 2014). Bei der bakteriellen Tyrosinase TYSc aus *S. castaneoglobisporus* konnte diese Flexibilität anhand der ermittelten B-Faktoren erstmalig gezeigt werden (Matoba et al., 2006). Hier war der B-Faktor des H_{A2} -Rests deutlich höher als für die übrigen Kupfer-koordinierenden Histidine. (Matoba et al., 2006). Wie bereits in 2.1 diskutiert, konnte dieses Ergebnis für die bakterielle Tyrosinase aus *B. megaterium* bestätigt werden. (Goldfeder et al., 2013). Hier wurde postuliert, dass durch die Erhöhung der Flexibilität von H_{A2} bei Abwesenheit eines Thioethers in Verbindung mit einem ebenfalls flexiblen *Gate-Residues*, die beschriebene

Substratrotation am CuA-Ion gewährleistet wird und somit die Hydroxilierung der Monophenole begünstigt werden könnte (Goldfeder et al., 2013, Goldfeder et al., 2014). Diese Rotation sei eine Voraussetzung für den elektrophilen Angriff auf die *ortho*-Position der monophenolischen Substrate (Deeth und Diedrich, 2010; Goldfeder et al., 2014). Jedoch zeigt das Beispiel der Catecholoxidase AoCO-4 aus *A. oryzae*, bei welcher aufgrund des Fehlens eines Thioethers der betroffene H_{A2}-Rest (H110) ebenfalls flexibel ist, dass die Monophenolase-Aktivität dennoch supprimiert wird (Hakulinen et al., 2013). Auch finden sich hier keine anderen sterisch restriktiven Elemente am Zugang zum Dikupfer-Zentrum, welche den Zutritt zum aktiven Zentrum für bestimmte Substrate blockieren könnten. Daher sollte auf molekularer Ebene unabhängig von der Präsenz oder Abwesenheit von Thioethern in Kombination mit den diskutierten *Gate-Residues* nach anderen Faktoren gesucht werden, die eine Unterscheidung von Tyrosinasen und Catecholoxidasen erlauben könnten.

Wie aus Abbildung 29 ersichtlich wird, lassen sich die „4- α -Helix-Bündel-Motive“ mit den zugehörigen Thioether-Motiven für Tyrosinasen und andere Typ 3-Kupferproteine unterschiedlichster Organismen nahezu perfekt superpositionieren. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass diese Strukturelemente wichtige Funktionen in den jeweiligen Proteinen übernehmen müssen. Für Typ 3-Kupferproteine mit langen Thioether-Motiven (charakteristisch für pflanzliche PPOs) zeigt sich, wie bereits beschrieben, dass die entsprechenden H_{A2}-Reste auf flexiblen Schleifen und die räumlich benachbarten Cysteine auf starren α -Helices lokalisiert sind. Folglich werden die H_{A2}-Reste hierdurch stabilisiert. Bei den kurzen Thioether-Motiven, welche typisch für Pilz-Tyrosinasen und Hämocyanine der Mollusken sind, befinden sich jedoch sowohl die H_{A2}-Reste, als auch die benachbarten Cysteine auf identischen, flexiblen Schleifen (Cuff et al., 1998; Ismaya et al., 2011; Fujieda et al., 2013; Mauracher et al., 2014). Aufgrund dieser Tatsache stellt sich nun die Frage, wie ein stabilisierender Effekt zustande kommen kann, wenn beide Elemente auf identischen, flexiblen Schleifen platziert sind. Dies kann nur hinreichend dadurch beantwortet werden, dass ein induzierter stabilisierender Effekt durch diese spezifischen Motive unwahrscheinlich ist und die Funktion weiterhin unbekannt bleibt. Diesbezüglich könnten weitere Mutagenese-Studien auf Position des Cysteins Aufschluss über die tatsächliche Funktion der spezifischen Thioether liefern.

2.3 Aminosäurereste mit Platzhalter-Funktion

Am Zugang zu den katalytischen Zentren verschiedener Typ 3-Kupferproteine übernehmen bestimmte Aminosäurereste eine Platzhalter-Funktion für die eigentlichen Substrate. Aus den bekannten Kristallstrukturen lässt sich ableiten, dass diese annähernd identische Position an den Dikupfer-Zentren einnehmen, wie die jeweiligen Substrate und diesen in einigen Fällen in räumlicher Gestalt ähneln können (Cuff et al., 1998; Gerdemann et al., 2002a; Matoba et al., 2006; Decker et al., 2007). Die inertesten und meist hydrophoben Aminosäuren gewährleisten, dass die Enzyme als

Vorläuferproteine in einem latenten Zustand gehalten werden (van Gelder et al., 1997; Marusek et al., 2006; Decker et al., 2006; Decker et al., 2007). Da sie den Zugang zum aktiven Zentrum blockieren, müssen sie bei der Aktivierung zu den enzymatisch aktiven Formen entfernt werden (Yoruk und Marshall, 2003; Mayer, 2006; Decker et al., 2007). *In vivo* kann dies zum einen durch induzierte Konformationsänderungen oder durch limitierte Proteolyse erfolgen (Decker und Rimke, 1998; Goldbeck und Cammarata, 1981; King und Flurkey, 1987; Robinson und Dry, 1992; Aspán und Söderhäll, 1991; Cong et al., 2009; Coates et al., 2011; Naresh et al., 2015). Letzteres ist besonders für die Prophenoloxidasen (pPO) der Arthropoden sowie für pflanzliche PPOs und den Tyrosinasen von Pilzen berichtet worden (Aspán und Söderhäll, 1991; Yoruk und Marshall, 2003; Mayer, 2006; Fujieda et al., 2013). Bei den Hämocyaninen und pPOs der Arthropoden werden die Platzhalter (meist konservierte Phenylalanine) von der N-terminalen Domäne bereitgestellt (Domäne 1), auf welche die katalytische Mitteldomäne und die C-terminale Domäne folgen. Bei den Hämocyaninen der Mollusken, den Tyrosinasen der Pilze und den pflanzlichen PPOs sind die Platzhalter meist aliphatisch und befinden sich im Bereich der C-terminalen Domäne (van Gelder et al., 1997; Cuff et al., 1998; Decker et al., 2001; Marusek et al., 2006; Fujieda et al., 2013; Mauracher et al., 2014; Molitor et al., 2016). In latenten pflanzlichen PPOs, einigen Tyrosinasen der Pilze und den Hämocyaninen der Mollusken verdeckt die C-terminale Domäne den Zugang zum katalytischen Zentrum, wobei der Platzhalter in Richtung der hydrophoben katalytischen Tasche weist und diese hierdurch blockiert (Cuff et al., 1998; Marusek et al., 2006; Mayer et al., 2006; Fujieda et al., 2013; Mauracher et al., 2014). Bislang war die genaue strukturelle Topologie der C-terminalen Domänen von pflanzlichen PPOs nicht bekannt, da die verfügbaren Kristallstrukturen lediglich (*IbCO-1*, *1BT3*; *VvPPOg*, *2P3X*, *JrPPO*, *5CE9*) von den prozessierten N-terminalen katalytischen Einheiten ermittelt worden waren (Klabunde et al., 1998; Virador et al., 2010; Bijelic et al., 2015). Hier stammte die Information über die räumliche Lage der Platzhalter aus Homologiemodellen, die auf Basis der strukturell verwandten FU eines Mollusken-Hämocyanins aus *O. dofleini* (*1JS8*) erstellt wurden (Cuff et al., 1998; Gerdemann et al., 2002a; Decker et al., 2007; Dirks-Hofmeister et al., 2014). Vor kurzer Zeit wurde jedoch eine Kristallstruktur einer vollständigen latenten PPO (*CgAUS1*, *4Z12*) aus *C. grandiflora* gelöst (Molitor et al., 2016). Hier konnte demonstriert werden, dass sich auf Position des Platzhalters ein Isoleucin (*I456*) befindet (siehe, Abb. 30). Im latenten Zustand nimmt *I456* die räumliche Lage zwischen H_{B2} und dem *Gate-Residue* (*F273*) ein, wodurch der Zugang zum Dikupfer-Zentrum für Substrate versperrt wird. Aus Homologiemodellen auf Basis der C-terminalen Domäne von *CgAUS1* (*4Z12*) konnte für *L-VvPPOg* und den in dieser Arbeit sequenzierten *L-VvPPOcs-2* sowie *L-VvPPOcs-3* eine ähnliche Lage für konservierte Valine

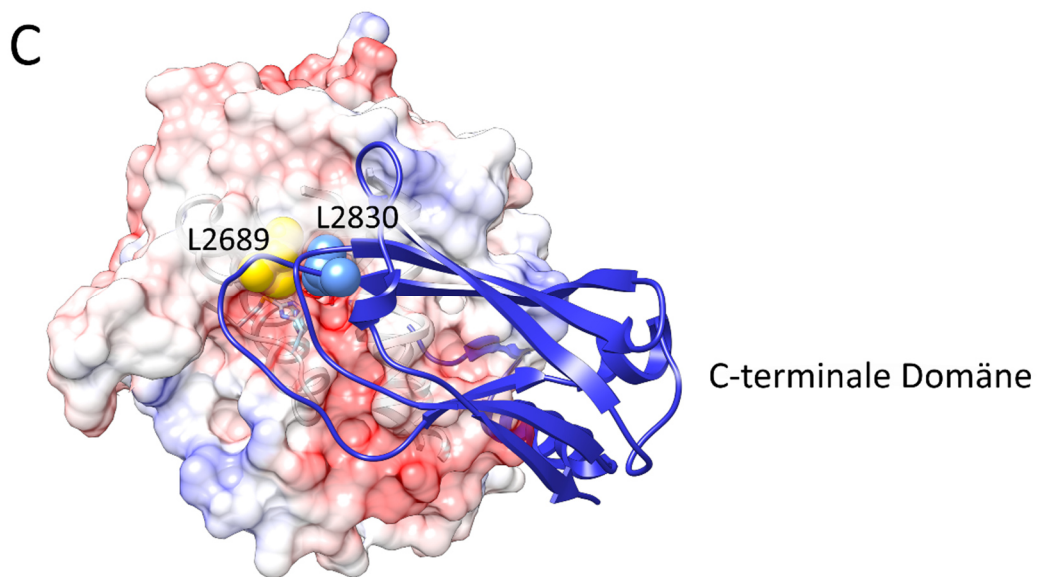
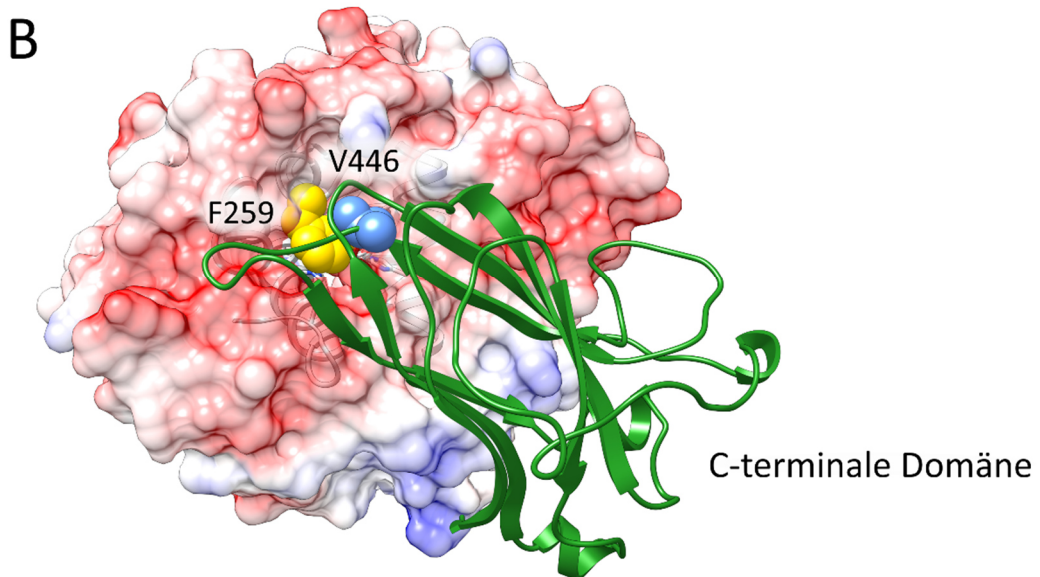
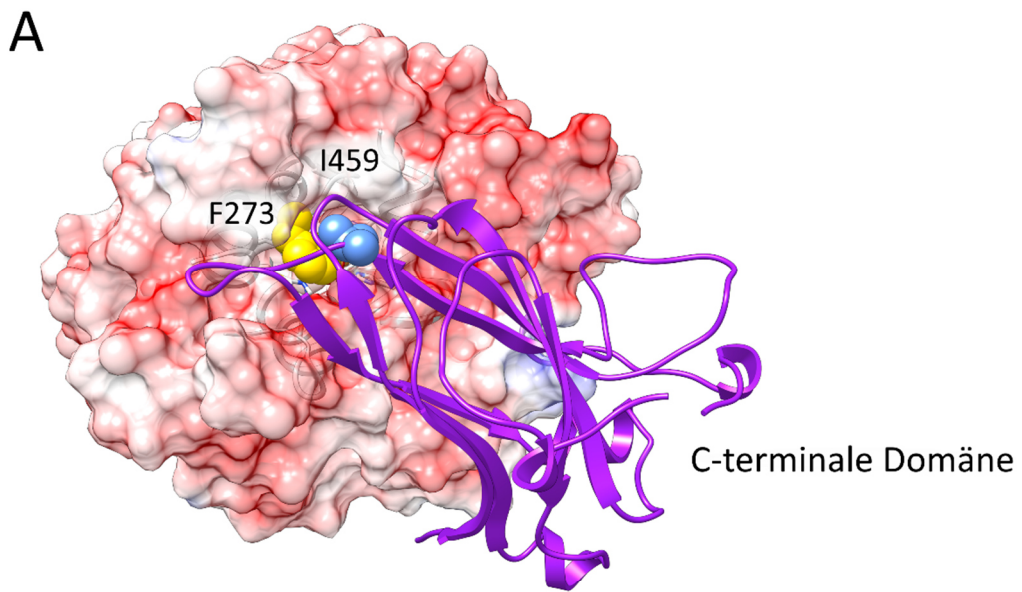


Abb. 30: Tertiärstrukturen zweier latenter pflanzlicher PPOs und zur Verdeutlichung der räumlichen Position des Platzhalters. Dargestellt sind die N-terminalen katalytischen Domänen mit den jeweiligen berechneten Oberflächen. Diese sind nach der Coulomb-Ladungsverteilung eingefärbt (blau=negativ und rot=positiv). Die Platzhalter (hellblau) und die interagierenden *Gate-Residues* (gelb) sind jeweils in der Kalotten-Darstellung abgebildet. Die C-terminalen regulativen Domänen sind im Bändermodell dargestellt. (A) Tertiärstruktur der Aureusidin Synthase CgAUS1 (PDB-ID: 4Z12) einer speziellen PPO aus *C. grandiflora*. Hier nimmt Ile456 die Position des Platzhalters ein und wird von der C-terminalen Domäne (violett) bereitgestellt. (B) Tertiärstruktur der N-terminalen Domäne von VvPPOg (PDB-ID: 2P3X) und des rekonstruierten Homologiemodells der C-terminalen Domäne (grün). Hier befindet sich ein Valin (Val556) auf Position des Platzhalters. (C) Tertiärstruktur der FU eines Hämocyansins aus *O. dofleini* (PDB-ID: 1JS8). Hier ist die C-terminale Domäne (blau dargestellt). Die C-terminale Domäne von VvPPOg wurde auf Basis von 4Z12 unter Verwendung des Programms Modeller Version 9.15 (Sali und Blundell, 1993) erstellt.

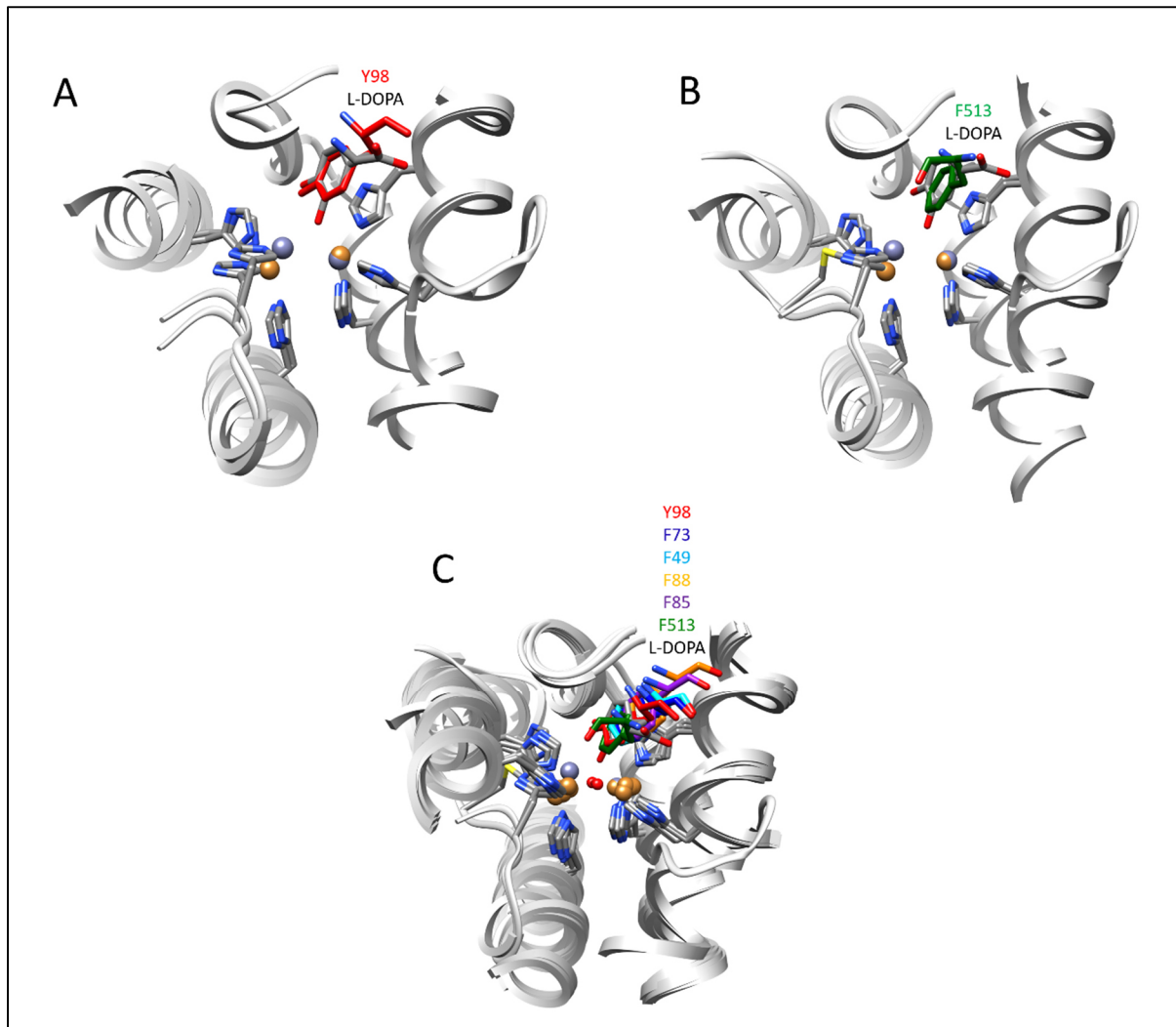


Abb. 31: Struktureller Vergleich von 4- α -Helix-Bündel-Motiven aus Typ 3-Kupferproteinen unterschiedlichster Organismen zur Verdeutlichung der räumlichen Lage der jeweiligen Platzhalter relativ zur Position eines koordinierten Substrats (L-DOPA). (A) Superposition von TYSc (1WX3) aus *S. castaneoglobisporus* mit zugehörigem Platzhalter (Y98, rot dargestellt) des *Caddie*-Proteins und TYBm (4P6S) aus *B. megaterium*, für welches das gezeigte L-DOPA (grau dargestellt) kokristallisiert wurde. Dies gelang mit Hilfe eines Austauschs der Cu-Ionen gegen inerte Zn-Ionen, wodurch das Substrat in einem koordinierten Zustand an ZnA kristallisiert werden konnte (Goldfeder et al., 2014). (B) Superposition der Tyrosinase (3W6W) von *A. orycae* mit zugehörigem Platzhalter (F513, grün dargestellt) und TYBm. (C) Superposition von pPOMs-1 (3HHS-A) und pPOMs-2 (3HHS-B) aus *M. sexta* (zugehörige Platzhalter: pPOMs-1, F88, orange dargestellt; pPOMs-2, F85, violett dargestellt), LiHC (1OXY) aus *L. polyphemus* (zugehöriger Platzhalter, F49, cyan dargestellt), pPOMj (3WKY) aus *M. japonicus* (zugehöriger Platzhalter: F73, blau dargestellt), TYSc (L-DOPA, grau dargestellt) und der Tyrosinase (3W6W) von *A. orycae* (zugehöriger Platzhalter: F513, grün dargestellt)

(L-VvPPOcs-2, V446; VvPPOcs-3 V447) ermittelt werden. Während bei den pflanzlichen PPOs, wie erwähnt, aliphatische Aminosäurereste die Position des Platzhalters besetzen (V, L und I), finden sich

bei den Hämocyaninen und pPOs der Arthropoden sowie einiger Pilz-Tyrosinasen Phenylalanine an analoger Stelle (siehe Abb. 31) (Fujida et al., 2013; Decker et al., 2007; Li et al., 2009; Masuda et al., 2014; Hu et al., 2016). Wie in Abbildung 31 (C) dargestellt ist, besetzen diese Phenylalanine sehr ähnliche Positionen, wie das Substrat (L-DOPA) in der TYBm-Struktur (4P6S) aus *B. megaterium*. Ein Beispiel für eine Tyrosinase bei welcher der Platzhalter ein mögliches Substrat darstellen könnte, zeigt sich bei TYSc aus *S. castaneoglobisporus*. Dieses bildet im inaktiven latenten Zustand ein Heterodimer mit einem ORF378 (Matoba et al., 2006). Dieses auch als *Caddie* bekannte Protein übernimmt höchstwahrscheinlich eine ähnliche Funktion, wie die C-terminale Domäne der z.B. pflanzlichen PPOs (Matoba et al., 2006). Allerdings ist der Platzhalter in diesem Fall nicht aliphatisch wie bei vielen PPOs, sondern ein Tyrosin. Dieses reicht in den Zugang zur hydrophoben katalytischen Tasche und wird bei Aktivierung des Enzyms durch Dissoziation des *Caddie*-Proteins entfernt (Matoba et al., 2006). Aufgrund der Tatsache, dass Tyrosin ein natürliches Substrat für Tyrosinasen darstellt und die räumliche Nähe zum Dikupfer-Zentrum gegeben ist (Abb. 31), liegt es nahe zu vermuten, dass das Tyrosin als potentielles Substrat durch die Monophenolase-Aktivität des Enzyms umgesetzt werden könnte. Anhand der Kristallstruktur (1WX3) ist aber zu erkennen, dass der Abstand der Hydroxygruppe zu CuA mit ca. 4,5 Å zu groß für einen katalytischen Umsatz ist (Decker et al., 2006).

3. Einfluss zweier konservierter Aminosäuren auf die Mono- und Diphenolase-Aktivität

Anhand der Ergebnissen zu den Mutagenese-Experimenten am *Gate-Residue* konnte kein direkter Zusammenhang zwischen potentiell induzierten sterischen Effekten durch das *Gate-Residue* und der damit verbundenen postulierten Einschränkung auf Diphenolase-Aktivitäten bei PPOs erkannt werden. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit eine weitere Hypothese verfolgt, welche es erlauben könnte, Tyrosinasen und Catecholoxidasen auf molekularer Ebene zu unterscheiden. Ausgehend von den 3D-Rekonstruktionen der Tyrosinase des Bakteriums *B. megaterium* (TYBm, PDB-IDs: 4P6R, 4P6S, 4P6T), welche jeweils mit gebundenen mono- bzw. diphenolischen Substraten kristallisiert wurden, liegt der Fokus hierbei auf der Präsenz eines konservierten Wassermoleküls (Goldfeder et al., 2014). Dieses wird durch ein Glutamat (E195, H_{B1}-9) und ein Asparagin (N205, H_{B1}+1) in direkter Nähe zu den beiden Cu-Motiven des aktiven Zentrums, über zwei Wasserstoffbrücken in der Proteinmatrix fixiert (Goldfeder et al., 2014). Der Strukturvergleich mit den gelösten Kristallstrukturen anderer Typ 3-Kupferproteine zeigt, dass sich diese Wassermoleküle mit geringen RMSD-Abweichungen von 0,4 – 1,3 Å (in Bezug auf HOH434 aus der 4P6T-Struktur) auf nahezu identischen Positionen befinden. Im Rahmen der oben genannten Publikation wurde für TYBm aus *B. megaterium* diskutiert, dass dieses Wassermolekül durch Glutamat und Asparagin aktiviert werden könnte. Hierdurch könnten monophenolische Substrate vor Eintritt in das aktive Zentrum deprotoniert werden (Solem et al., 2016). Die

entstandenen Phenolate binden anschließend an die CuA-Bindungsstelle. Wie bereits in 2.1 dargestellt wurde, konnte dies anhand kokristallisierter mono- und diphenolischer Substrate (4P6S: L-DOPA, 4P6R: Tyrosin, 4P6T: *p*-Tyrosol) für die Tyrosinase von *B. megaterium* gezeigt werden (Goldfeder et al., 2014). Evidenzen aus der Modellchemie weisen darauf hin, dass ein Deprotonierungsschritt entscheidend für die Monophenolase-Aktivität ist (Rolff et al., 2011).

In der vorliegenden Arbeit wurden Primärstrukturen von pflanzlichen PPOs mit den Primär- und Tertiärstrukturdaten bakterieller Tyrosinasen (*S. castaneoglobisporus*, PDB-ID: 3AWX und *B. megaterium*, PDB-ID: 3NM8), den Pilz-Tyrosinasen (*A. bisporus*, PDB-ID: 2Y9W, 4OUA; *A. orycea*, PDB-

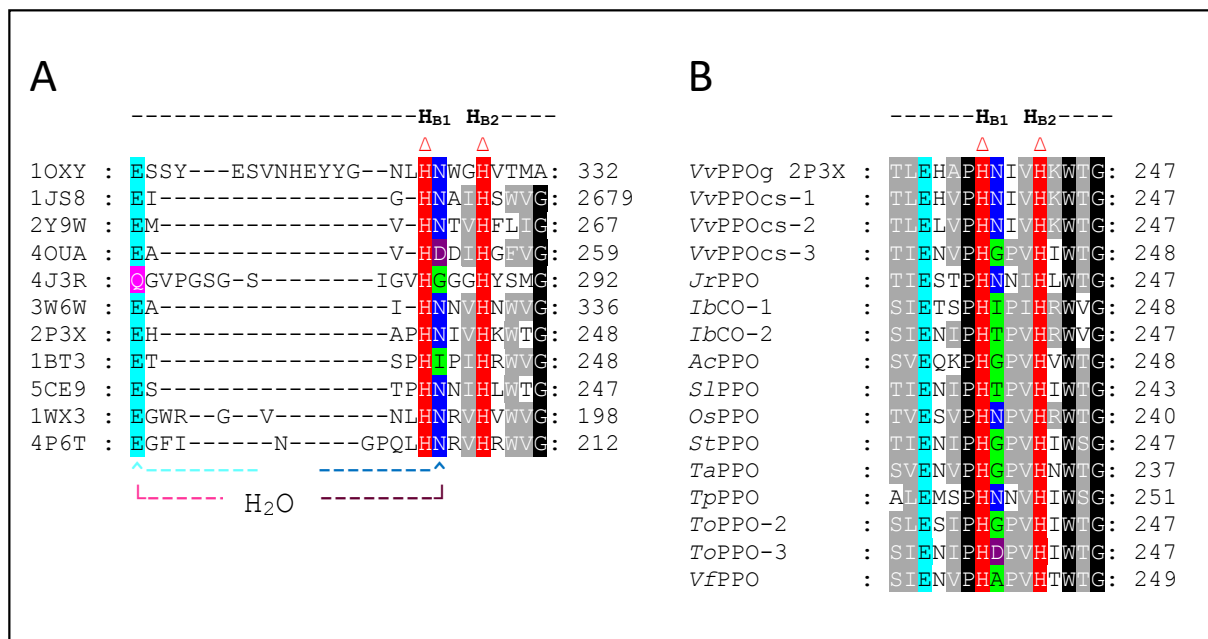


Abb. 32: Sequenzvergleiche der CuB-Teilmodule unterschiedlicher Typ 3-Kupferproteine. Dargestellt sind die Bereiche um H_{B1} und H_{B2} (rot hinterlegt) der CuB-Motive. Die Positionen mit identischen Aminosäuren sind schwarz hinterlegt, während ähnliche Bereiche grau markiert sind. (A) Mittels UCSF Chimera (Version 1.11.1) generiertes Struktur-basiertes Alignment gelöster Kristallstrukturen verschiedener Typ 3-Kupferproteine. In allen aufgeführten Strukturen ist das beschriebene Wassermolekül auf nahezu identischen Positionen konserviert, und entweder über eine oder zwei Wasserstoffbrücken an die Proteinmatrix gebunden. Bei den meisten Tyrosinase-Strukturen und der beiden gezeigten Hämocyanine (1JS8 und 10XY), spannen sich die fixierenden Wasserstoffbrücken zwischen dem Carboxyl-Sauerstoff einer hoch konservierten Glutaminsäure (cyan), sowie dem Amid-Sauerstoffs eines Asparagins (blau) auf (gestrichelte Linien). Eine Ausnahme unter den gezeigten Tyrosinase-Strukturen stellt AbPPO-4 (4OUA) von *A. bisporus* dar. Hier ist das Asparagin durch eine Asparaginsäure (D252, violett) ersetzt. In diesem Fall wird das Wassermolekül über zwei Carboxyl-Sauerstoffatome fixiert. Bei den Catecholoxidasen hingegen, scheinen adäquate korrespondierende Dipolpartner für eine zweite Wasserstoff-Brücke zu fehlen. Beispiele hierfür sind *IbCO-1* (*I. batatas*, PDB-ID: 1BT3) und *AoCO-4* (*A. orycea*, PDB-ID: 4J3R). Bei *IbCO-1* ist das Asparagin durch ein Isoleucin (I241) ausgetauscht. Hier wird das Wassermolekül über ein Carboxyl-Sauerstoff der Glutaminsäure gebunden. Bei *AoCO-4* besetzt ein Glycin (G285) die analoge Stelle. Zudem ist die konservierte Glutaminsäure durch ein Glutamin (Q273, pink) ersetzt. Hier erfolgt die Bindung des Wassers wahrscheinlich über den Amid-Sauerstoff des Glutamins. (B) Mittels MUSCLE generiertes multiples Sequenzalignment ausgewählter pflanzlicher PPOs (Zugriffsschlüssel s. Anhang). Hier zeigt sich, dass die Glutaminsäure (E, cyan) zu 100 % konserviert ist, dagegen weist die Position des Asparagins (N, blau) deutliche Unterschiede (grün) auf. Für die im Alignment repräsentierten PPOs mit ausschließlicher Diphenolase-Aktivität (L-VvPPOcs-3, L-ToPPO-2, *IbCO-1* sowie VfPPO) ist das Asparagin durch die grün hinterlegten Aminosäuren Glycin (G), Threonin (T), Isoleucin (I) oder Alanin (A) ersetzt (King und Flurkey, 1987; Klabunde et al., 1998; Dirks-Hofmeister et al., 2014, Solem et al., 2016). Bei PPOs mit nachweisbarer Monophenolase-Aktivität (*JrPPO* und L-VvPPOcs-2) ist das Asparagin hingegen konserviert. Die Accession-Nummern sowie die Art- und Gattungsnamen zu den einzelnen Sequenzen sind im Anhang aufgeführt (siehe G 1.4, Tabelle 28).

ID: , 3W6W) und einer Pilz-Catecholoxidase (*A. orycea*, *AoCO-4*, PDB-ID: 4J3P), sowie zweier

Hämocyanine (*P. interruptus*, PDB-ID: 1HCY; *O. dofleini*, PDB-ID: 1JS8) verglichen. Hierbei wurde

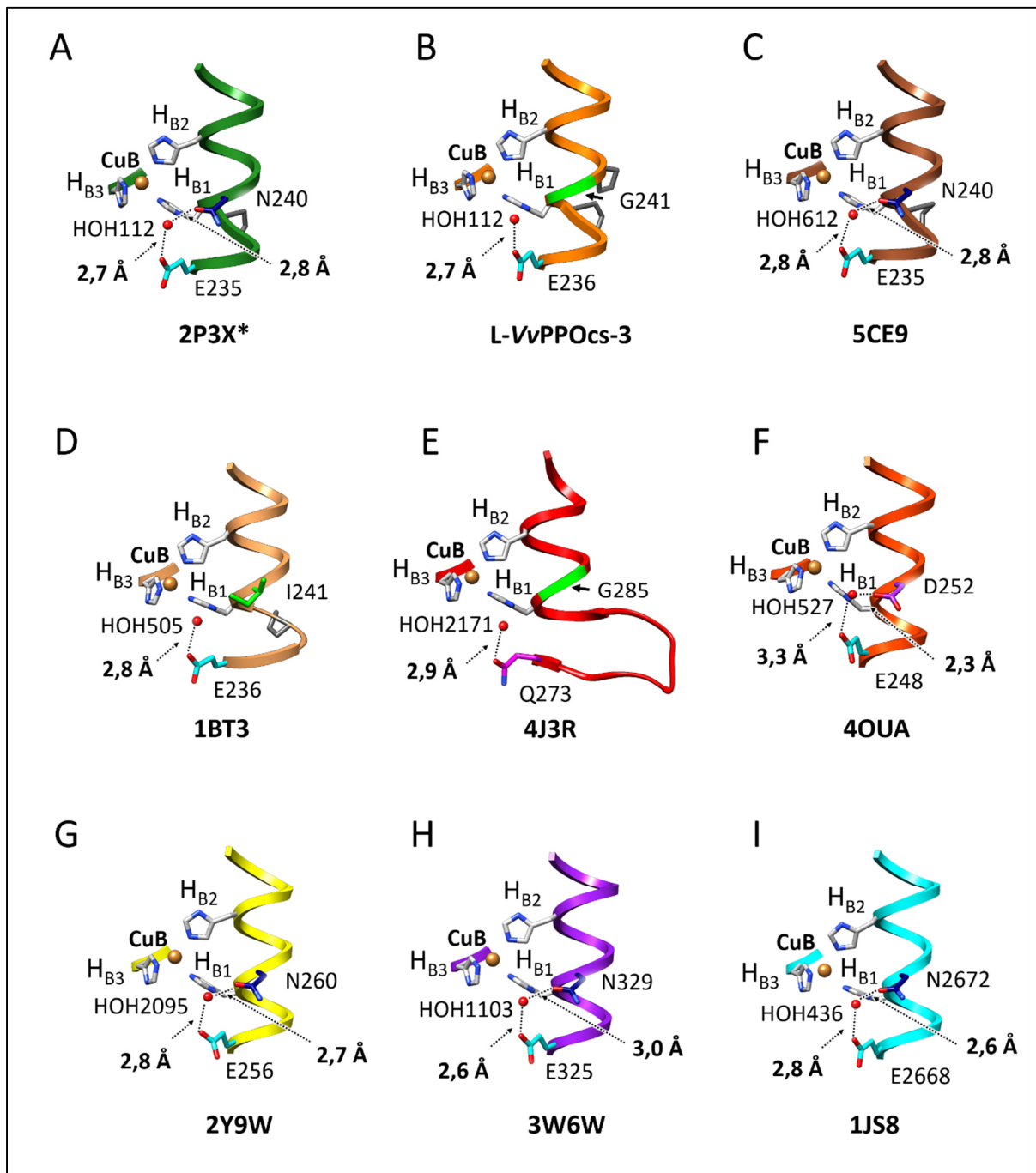


Abb. 33: Teilstrukturen der Cu-B-Motive ausgewählter Typ 3-Kupferproteine im Bändermodell. Gezeigt ist die Lokalisation des konservierten Wassers (HOH) in den jeweiligen Kristallstrukturen. Zusätzlich sind die Wasserstoffbrücken mit den zugehörigen Bindungslängen in Å angegeben. Die entsprechenden PDB-IDs sind jeweils unter den Teilstrukturen aufgeführt. Bei den Tyrosinasen der Pilze (F, G und H) sowie bei Hämocyaninen (I) ist das konservierte Wassermolekül über jeweils zwei Wasserstoffbrücken (Bindungslängen: 2,3 – 3,3 Å) mit der Proteinmatrix gekoppelt. Ähnliches gilt auch für die pflanzlichen PPOs mit nachweisbarer Monophenolase-Aktivität (A und C). Bei Catecholoxidasen (D und E), wird das Wassermolekül hingegen durch eine singuläre Wasserstoffbrücke gebunden. (B) Homologiemodell des L-VvPPOcs-3 auf Basis der verfeinerten Struktur von VvPPO (2P3X*). Hierfür wurden die Kupferionen des aktiven Zentrums und die Wassermoleküle aus der 2P3X*-Struktur übernommen. Wie für die beiden anderen Catecholoxidasen (1BT3 und 4J3R) bereits auf Primärstrukturebene exemplarisch gezeigt, fehlt auch hier auf Grund des Austauschs von Asparagin gegen Glycin (G241), ein adäquater Dipolpartner für eine zweite Wasserstoffbrücke. *[Bei (A) handelt es sich um eine von [REDACTED] verfeinerten 2P3X-Struktur, für welche HOH112 nachträglich aufgelöst werden konnte (Solem et al., 2016)]

speziell auf die Präsenz des Glutamats und des Asparagins geachtet. Die Sequenzvergleiche zeigten, dass das Glutamat mit Ausnahme der Catecholoxidase AoCO-4 von *A. orycae* (PDB-ID: 4J3P) strikt konserviert ist, während sich die Position des Asparagins etwas variabler gestaltet (siehe Abb. 32). Besonders auffällig sind diese Unterschiede bei den pflanzlichen PPOs aus *I. batatas* (*IbCO-1*), *T. officinale* (*ToPPO-2*) und *V. faba* (*VfPPO*), welche sich als Catecholoxidasen auszeichnen (King und Flurkey, 1987; Klabunde et al., 1998; Dirks-Hofmeister et al., 2014; Leufken et al. 2015). Bei *IbCO-1* (PDB-ID: 1BT3) beispielsweise, ist das Asparagin durch ein Isoleucin (I241) „ersetzt“. Hierdurch wird das konservierte Wassermolekül (HOH505) über eine singuläre Wasserstoffbrücke mit einer Bindungslänge von 2,8 Å gebunden (siehe Abb. 33). Als Dipolpartner fungiert hier ebenfalls der Carboxyl-Sauerstoff des Glutamatrests (E236).

Ein weiteres Beispiel für eine Catecholoxidase, bei welcher das Asparagin substituiert ist, findet sich bei AoCO-4 von *A. orycae* (Gasparetti et al., 2010). Hier ist ein Glycin (G285) auf Position H_{B1}+1 lokalisiert. Zudem befindet sich an Position H_{B1}-11 der sonst strikt konservierten Glutaminsäure ein Glutamin (Q273, 4J3R) (Hakulinen et al., 2013). In diesem speziellen Fall wird das ebenfalls konservierte Wassermolekül (HOH2171) wahrscheinlich über den Amid-Sauerstoff des Glutamin-Rests gebunden. Im Hinblick auf die bisher gelösten Kristallstrukturen von Tyrosinasen und Hämocyaninen, sind die Positionen des Glutamats sowie des Asparagins hoch konserviert und die entsprechenden Wassermoleküle über jeweils zwei Wasserstoffbrücken mit spezifischen Bindungslängen von 2,6 - 3,3 Å fixiert (Abb. 33). Diese werden in der Regel über den Carboxyl- bzw. Amid-Sauerstoff der jeweiligen Aminosäurereste vermittelt. Hierbei stellen die Tyrosinasen bestimmter Pilze jedoch eine Ausnahme dar. Wie in den Abbildungen 32 (B) und 33 (F und G) zu erkennen ist, besitzen einige Tyrosinasen neben den konservierten Asparaginen auch Aspartate. Dies ist beispielsweise charakteristisch für *AbPPO-4* (PDB-ID: 4OUA) aus *A. bisporus*. Hier besetzt D252 die Position H_{B1}+1 (Abb. 32, A). In diesem Beispiel dienen dem Wassermolekül (HOH527) zwei Carboxylat-Gruppen als Dipolpartner für die Bildung der Wasserstoffbrücken. Ähnliches findet sich auch bei *ToPPO-3* aus *T. officinale* (Abb. 32, B). Da für dieses Protein bislang noch keine enzymatische Charakterisierung vorliegt, lässt sich jedoch keine Aussage über einen eventuellen Umsatz von Monophenolen treffen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei allen bisher kristallisierten Typ 3-Kupferproteinen mit ausgeprägter Monophenolase-Aktivität, sowohl das Wassermolekül, als auch die Glutaminsäure konserviert sind, während das Asparagin in manchen Fällen durch ein Aspartat „ersetzt“ sein kann. In beiden Fällen wird das Wassermolekül jedoch über zwei Wasserstoffbrücken fixiert, was höchstwahrscheinlich ein wichtiges Kriterium für die Aktivierung und der damit verbundenen hypothetischen Deprotonierung monophenolischer Substrate ist (Matoba et al., 2006, Decker et al, 2006, Rolff et al 2011; Solem et al., 2016). Im Gegensatz dazu, scheint den bekannten Catecholoxidasen

ein adäquater zweiter korrespondierender Dipolpartner zu fehlen und das Wassermolekül wird lediglich über eine Wasserstoffbrücke gebunden.

Um die oben genannte Hypothese experimentell überprüfen zu können, wurde auf Grundlage des rekombinanten L-VvPPOcs-3 im Rahmen dieser Arbeit, eine weitere Mutagenese-Studie durchgeführt. In Vorversuchen zur enzymatischen Aktivität des rekombinanten L-VvPPOcs-3 konnte mit Hilfe eines qualitativen biochemischen Assays, nur der Umsatz von Diphenolen eindeutig nachgewiesen werden. Bei Abgleich der Primärstrukturen der in dieser Arbeit sequenzierten Isoformen zeigte sich für L-VvPPOcs-2, dass N240 auf Position $H_{B1}+1$ konserviert ist. Im Vergleich dazu besitzt die Primärstruktur von L-VvPPOcs-3 jedoch ein Glycin (G241) auf analoger Position. Aus diesem Grund sollte G241 in ein Asparagin mutiert werden, um zu untersuchen, ob sich auf diese Weise eine distinkte Monophenolase-Aktivität für L-VvPPOcs-3 etablieren lässt. Eine weitere strukturelle Auffälligkeit des L-VvPPOcs-3 ist die Präsenz zweier Proline auf den Positionen $H_{B1}-1$ (P239) und $H_{B1}+2$ (P241). Während P239 für viele pflanzliche PPOs hoch konserviert ist (Abb. 32), stellt P241 ein strukturelles Charakteristikum für L-VvPPOcs-3 und *IbCO-1* dar. Da Proline bekanntlich die Integrität von α -Helices stören können und das benachbarte H_{B1} durch eine α -Helix (siehe Kapitel C 3., Abb. 21, Helix 11) stabilisiert wird, sollte ebenfalls geklärt werden, ob die beiden Proline eventuell einen negativen Einfluss auf die Monophenolase-Aktivität haben könnten. Diese fehlen in den Tyrosinasen anderer Organismen, wodurch eine durchgehende Helix resultiert. Zu diesem Zweck, wurde mittels PCR-basierter ortsgerichteter Mutagenese auf Basis des L-VvPPOcs-3-Konstrukts, neben G241N die beiden zusätzlichen Muteine G241N/P242I und P239del/G241N/P242I erzeugt und gereinigt.

Mittels qualitativen MBTH-Assay konnte für G241N nach Aktivierung mit SDS für den Umsatz der Monophenole Tyramin und *p*-Tyrosol festgestellt werden, dass die eingesetzten Substrate effektiv zu den korrespondierenden *o*-Chinonen umgesetzt wurden (Solem et al., 2016). Zwar zeigte der Wildtyp ebenfalls äußerst geringe Aktivitäten, aber im direkten Vergleich waren die erzielten Farbintensitäten für das G241N-Mutein um ein Vielfaches höher (siehe Kapitel C 3.3, Abb. 25). Dieses Ergebnis zeigt erstmalig eine Catecholoxidase, welche mittels ortsgerichteter Mutagenese zu einer Tyrosinase konvertiert werden konnte. Die hiermit verbundene Substitution eines Glycins gegen ein Asparagin stützt die Hypothese, dass das eingeführte Asparagin gemeinsam mit dem konservierten Glutamat ein entscheidendes Kriterium für die Monophenolase-Aktivität ist (Goldfeder et al., 2014, Solem et al., 2016).

Für G241N/P242I und P239del/G241N/P242I konnte die Monophenolase-Aktivität für das Substrat *p*-Tyrosol gegenüber dem G241N-Mutein nochmals erhöht werden (C 3.3, Abb. 25). Hier zeigte P239del/G241N/P242I die höchsten Aktivitäten. Ähnliches konnte auch bei Umsatz des Diphenols 4-MC beobachtet werden (C 3.3, Abb. 26). Auch hier erwies sich das P239del/G241N/P242I als die aktivste Form, gefolgt von G241N/P242I sowie G241N mit nahezu identischen Aktivitäten und dem

Wildtyp mit den geringsten Intensitäten. Für den Umsatz von Tyramin ergaben sich jedoch für P239del/G241N/P242I im Vergleich zu den übrigen Muteinen, eine wesentlich geringere Aktivität. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Anwesenheit eines Asparagins neben einem konservierten Glutamat notwendig ist, um Monophenolase-Aktivitäten in pflanzlichen PPOs induzieren zu können. Die konservierten Proline hingegen scheinen hierbei die spezifischen Aktivitäten zu modulieren oder Substratspezifitäten hervorzurufen. Wenn beide Proline anwesend sind, jedoch das Asparagin substituiert ist, lässt sich feststellen, dass lediglich Diphenolase-Aktivitäten zu beobachten sind. Werden hingegen die Proline substituiert bzw. deletiert und das spezifische Asparagin ist vorhanden, ist der katalytische Umsatz für Monophenole erhöht. Dies steht in Übereinstimmung mit den Tyrosinasen aus anderen Organismen, wie Pilzen oder Bakterien (Matoba et al., 2006; Ismaya et al., 2011; Sendowski et al., 2011; Fujieda et al., 2013; Mauracher et al., 2014). Unabhängig von den beiden erwähnten Proline, nehmen die beiden Strukturelemente Glutamat und Asparagin sowie das konservierte Wassermolekül bei strukturellem Abgleich von Typ 3-Kupferproteinen unterschiedlichster Organismen, nahezu identische topologische Positionen ein. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Proline in den entsprechenden Strukturen keine signifikanten Strukturänderungen erzeugen.

4. Hypothetischer Deprotonierungsmechanismus der Monophenole

Für Typ 3-Kupferproteinen wurden inzwischen zahlreiche Hypothesen aufgestellt, die als Voraussetzung für einen katalytischen Umsatz von Monophenolen, die Anwesenheit von sogenannten „internen Basen“ fordern (Wilcox et al., 1984; Monzani et al., 1996; Tepper et al. 2005, Matoba et al., 2006; Decker et al., 2006; Rolff et al., 2011). Ein wichtiger Aspekt hierbei ist die Koordination der monophenolischen Substrate an die freie distale Koordinationsstelle in *trans*-Stellung zu H_{A3} am CuA-Ion von Typ 3-Kupferproteinen (Decker et al., 2006; Matoba et al., 2006). Diese erfordert eine Deprotonierung der Monophenole zu den korrespondierenden Phenolaten, welche anschließend an CuA koordiniert werden (Matoba et al., 2006; Decker et al., 2006; Rolff et al., 2011; Goldfeder et al., 2014). Die Suche nach bestimmten konservierten Aminosäuren, welche diese Funktion in den Tyrosinasen unterschiedlichster Organismen übernehmen könnten und sich dazu in direkter Nähe zum Dikupfer(II)-Peroxo-Komplex befinden, war bisher jedoch vergeblich (Volbeda und Hol, 1989; Matoba et al., 2006; Decker et al., 2006; Rolff et al 2011).

Anknüpfend an die von Goldfeder et al. (2014) vorgeschlagene Aktivierung von monophenolischen Substraten durch das konservierte Wassermolekül lässt sich für Tyrosinasen unter Annahme, dass das Wassermolekül die Funktion einer „internen Base“ übernimmt, folgender Mechanismus aufstellen:

Durch die Wasserstoffbrücken zu den beiden Aminosäureresten des Glutamats und Asparagins wird das konservierte Wassermolekül in einer Entfernung von ca. 3 Å zu den Seitenresten fixiert (siehe Abb.

34). Wenn sich das Substrat dem Dikupfer(II)-Peroxo-Zentrum nähert, orientiert sich das Wassermolekül mit den beiden freien Valenzelektronenpaaren in Richtung des Protons der *para*-

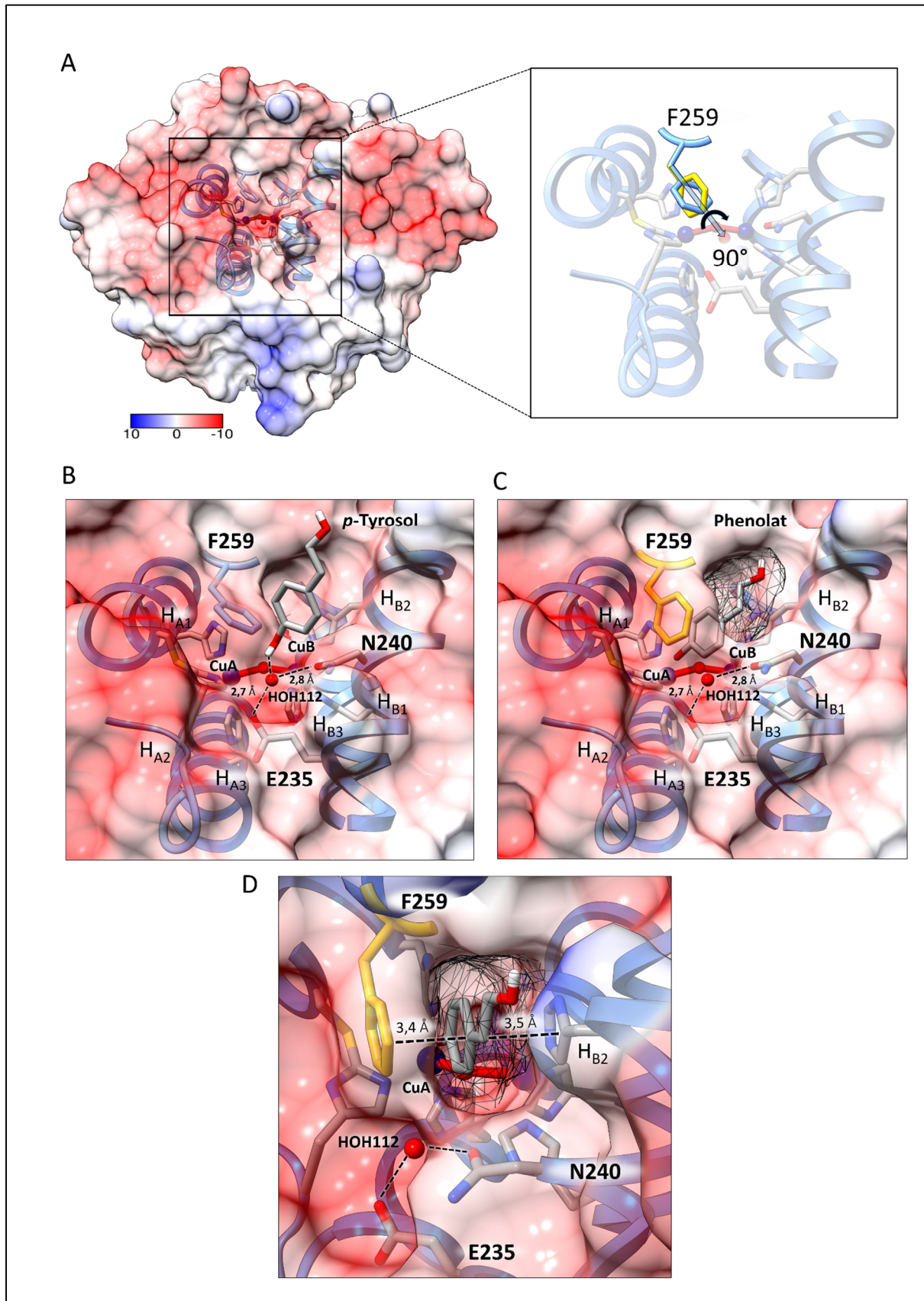


Abb. 34: Tertiärstruktur der verfeinerten Kristallstruktur von VvPPOg mit manuell eingepasstem Substrat *p*-Tyrosol zur visuellen Verdeutlichung des hypothetischen Deprotonierungsmechanismus. (A) Die Einpassung des Substrats erfolgte durch Superposition der verfeinerten Struktur 2P3X* und der Kristallstruktur der Tyrosinase von *B. megaterium* (PDB-ID: 4P6T). Für letztgenannte konnte das Substrat *p*-Tyrosol am aktiven Zentrum kokristallisiert werden (Goldfeder et al., 2014) Um eine Kollision der beiden aromatischen Ringsysteme des *p*-Tyrosols (Phenolat, mit der berechneten Oberfläche in der Gitterdarstellung) und des *Gate-Residues* (Phe259, blau) zu vermeiden, war es erforderlich den Phenylring des Phe259 um 90° (Rotation um $-C_{\beta}-C_{\gamma}$) zu drehen (rechte Detailansicht, blau nach gelb). Hierbei wurden die Van-der-Waals-Radien eingehalten. (B) Detailansicht des Zugangs zum aktiven Zentrum. Die Darstellung zeigt das eintretende *p*-Tyrosol. Als Protonakzeptor dient hier das Wassermolekül (HOH112), welches durch Glu235 und Asn240 über zwei Wasserstoff-Brücken (mit Bindungslängen von 2,7 Å und 2,8 Å) fixiert wird und bei diesem Prozess zu einem Hydroniumion protoniert wird. (C) Das entstandene Phenolat wird anschließend an das CuA-Ion des katalytischen Zentrums koordiniert. (D) Detailansicht des gebundenen Phenolats. Dieses wird durch π - π -Wechselwirkung (Abstand 3,5 Å) mit dem Imidazolring von H_{B2} vororientiert. Nach Einpassung des Phenolats besitzt dieses einen Abstand von 3,4 Å zum Phenylring des F259.

Hydroxygruppe des Monophenols. Das konservierte Wassermolekül fungiert hierbei als Protonenakzeptor und wird hierdurch zu einem Hydroniumion protoniert, während das gebildete Phenolat im Bereich der katalytischen Tasche durch π - π -Wechselwirkung mit H_{B2} in Richtung des CuA-Ions vororientiert wird. Anschließend kann sich das Phenolat zu CuA verschieben, wo es an die freie Koordinationsstelle in *trans*-Stellung zu H_{A3} in einem Abstand von ca. 2,1 Å koordiniert wird (siehe Abb. 34 und Abb. 35). Danach erfolgt ein elektrophiler Angriff des Peroxids auf die *ortho*-Position des Phenolats, was zu einem asymmetrisch gebundenen Catecholat führt. Das verbleibende Sauerstoffatom des Peroxids bildet ein verbrückendes Hydroxid. Daraufhin wird das koordinierte Catecholat in einem Zwei-Elektronen-Prozess oxidiert und als Chinon freigegeben. Dieser Reaktionsschritt wird durch den Rücktransfer des Protons über eine Entfernung von 3,5–4,5 Å vom Hydroniumion zum Hydroxidliganden erleichtert, wobei ein Wassermolekül entsteht (Abb. 35). Die beiden Kupfer-Ionen im katalytischen Zentrum werden hierbei zu Cu(I) reduziert und können anschließend erneut oxyniert werden.

Nach diesem vorgestellten Mechanismus kann der funktionelle Unterschied zwischen Tyrosinasen und Catecholoxidasen auf die Anwesenheit eines Asparagins und eines Glutamats zurückgeführt werden, welche gemeinsam das konservierte Wassermolekül binden. Letzteres übernimmt die Funktion einer „internen Base“ und wird durch die Deprotonierung des Monophenols zu einem Hydroniumion protoniert. Das gebildete Phenolat kann anschließend an das katalytische Zentrum koordiniert werden. Es ist wahrscheinlich, dass die Wechselwirkung mit einer einzigen Aminosäure, z.B. Glutamat, den pK_B des konservierten Wassers nicht ausreichend absenkt, um die Funktion einer „internen Base“ zu übernehmen. In diesem Fall ist nur eine Diphenolase-Aktivität möglich, die nicht von einem Deprotonierungsweg abhängt. Diese Schlussfolgerung ist in vollständiger Übereinstimmung mit den Resultaten niedermolekularer Modellsysteme für Typ 3-Kupferproteine (Lewis und Tolman, 2004).

Zusammenfassend demonstriert die vorgestellte Mutagenese-Studie am rekombinanten L-VvPPOcs-3 die Abhängigkeit der Monophenolase-Aktivität von einem Glutamat (E236), das mit einem Asparagin (N241) ein konserviertes Wassermolekül bindet und aktiviert, wodurch die Deprotonierung von monophenolischen Substraten induziert werden kann. Dieses Resultat wird durch die jüngst

E Zusammenfassung

Typ 3-Kupferproteine sind ubiquitär verbreitet. PPOs, die für pflanzliche Systeme charakteristisch sind, werden in enzymatische Tyrosinasen und Catecholoxidasen unterteilt.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausgehend von cDNA durch Klonierung und Sequenzierung drei PPO-Sequenzen aus der Weinrebe *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon ermittelt (L-VvPPOcs-1, L-VvPPOcs-2 und L-VvPPOcs-3). Diese wurden als zwei unterschiedliche Isoformen definiert, wovon eine vermutlich durch zwei Allele repräsentiert wird (L-VvPPOcs-1 und L-VvPPOcs-2). Hierbei wies L-VvPPOcs-1 eine Sequenzidentität von 98,8 % zu der von Virador et al. (2010) veröffentlichten Referenzstruktur L-VvPPOg (U83274) auf. Zudem gelang es für L-VvPPOcs-2 und L-VvPPOcs-3 ein heterologes rekombinantes Expressionssystem in *E. coli* zu etablieren. Dieses erlaubte eine Überexpression der latenten ca. 60 kDa schweren Isoenzyme als Strep-Tag II-Fusionsproteine in nativer Form, welche mittels Affinitätschromatographie in einer Reinheit von 90-95 % gewonnen werden konnten. Die biochemisch angereicherten latenten PPOs wurden anschließend nach Aktivierung mit SDS enzymatisch charakterisiert.

Mit Hilfe eines biochemischen Assays in nativer PAGE wurden die erhaltenen rekombinanten Enzyme sowohl auf Mono- als auch auf Diphenolase-Aktivitäten getestet. Für L-VvPPOcs-2 zeigten die Ergebnisse zum ersten Mal eine rekombinante pflanzliche PPO mit ausdrücklicher Monophenolase-Aktivität. Das rekombinante L-VvPPOcs-3 hingegen wies zwar ebenfalls eindeutige Diphenolase-Aktivitäten auf, jedoch konnte kein nennenswerter enzymatischer Umsatz für die eingesetzten Monophenole festgestellt werden, was dieses Isoenzym als Catecholoxidase auszeichnet. Ausgehend vom L-VvPPOcs-3-Expressionskonstrukt gelang es mit Hilfe von PCR-basierter ortsgerichteter Mutagenese durch Substitution eines Glycins gegen ein Asparagin das rekombinante L-VvPPOcs-3 in eine Tyrosinase mit definierter Monophenolase-Aktivität zu konvertieren. Für Typ 3-Kupferproteine zeigen diese Ergebnisse die Abhängigkeit der Monophenolase-Aktivität von der Präsenz eines Asparagins und eines konservierten Glutamats, welche gemeinsam ein ebenfalls konserviertes Wassermolekül binden und aktivieren. Letztgenanntes vermittelt höchstwahrscheinlich die Deprotonierung von monophenolischen Substraten, was die adäquate Koordination der gebildeten Phenolate an die CuA-Bindungsstelle ermöglicht. Die gebundenen Phenolate können anschließend in *ortho*-Stellung zu den korrespondierenden Catecholaten hydroxyliert werden. Die vorgestellten Ergebnisse erlauben die kontrovers diskutierte Unterscheidung von Catecholoxidasen und Tyrosinasen auf molekularer Ebene.

F Literatur

- Aguilera, F., McDougall, C., Degnan, B.M. (2013). Origin, evolution and classification of type-3 copper proteins: Lineage-specific gene expansions and losses across the Metazoa. *BMC Evol. Biol.* *13*, 96.
- Andreini, C., Banci, L., Bertini, I., Rosato, A. (2008). Occurrence of copper proteins through the three domains of life: A bioinformatic approach. *J. Proteome Res.* *7*, 209–216.
- Asghari, M., und Hasanlooe, A.R. (2016). Methyl jasmonate effectively enhanced some defense enzymes activity and total antioxidant content in harvested “sabrosa” strawberry fruit. *Food Sci. Nutr.* *4*, 377–383.
- Aspán, A. und Söderhäll, K. (1991). Purification of prophenoloxidase from crayfish blood cells, and its activation by an endogenous serine proteinase. *Insect Biochem.* *21*, 363–373.
- Bagby, S., Driscoll, P.C., Harvey, T.S., Hill, H.A. (1994). High-resolution solution structure of reduced parsley plastocyanin. *Biochemistry* *33*, 6611–6622.
- Bauer, M. (2014). Einfluss der Tyrosinaseaktivität auf phenolische Weininhaltsstoffe (Diplomarbeit) Institut für Molekulare Biophysik, JOGU, Mainz
- Bijelic, A., Pretzler, M., Molitor, C., Zekiri, F., Rempel, A. (2015). The structure of a plant tyrosinase from walnut leaves reveals the importance of “substrate-guiding residues” for enzymatic specificity. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* *54*, 14677–14680.
- Boeckx, T., Winters, A.L., Webb, K.J. Kingston-Smith, A.H. (2015). Polyphenol oxidase in leaves: is there any significance to the chloroplastic localization? *J. Exp. Bot.* *66*, 3571–3579.
- Bosch, M., Berger, S., Schaller, A., Stintzi, A. (2014). Jasmonate-dependent induction of polyphenol oxidase activity in tomato foliage is important for defense against *Spodoptera exigua* but not against *Manduca sexta*. *BMC Plant Biol.* *14*. 1-15
- Burmester, T. (2002). Origin and evolution of arthropod hemocyanins and related proteins. *J Comp. Physiol. B*, *172* 95–107.
- Burmester, T. und Scheller, K. (1996). Common origin of arthropod tyrosinase, arthropod hemocyanin, insect hexamerin, and dipteran arylphorin receptor. *J. Mol. Evol.* *42*, 713–728.
- Claus, H. (2004). Laccases: Structure, reactions, distribution. *Micron* *35*, 93–96.
- Claus, H. und Decker, H. (2006). Bacterial tyrosinases. *Syst. Appl. Microbiol.* *29*, 3–14.
- Coates, C.J., Kelly, S.M., Nairn, J. (2011). Possible role of phosphatidylserine-hemocyanin interaction in the innate immune response of *Limulus polyphemus*. *Dev. Comp. Immunol.* *35*, 155–163.
- Coates, C.J. und Nairn, J. (2014). Diverse immune functions of hemocyanins. *Dev. Comp. Immunol.* *45*, 43–55.
- Cohen T, Muller RM, Tomita Y, Shibahara S. (1990). Nucleotide sequence of the cDNA encoding human tyrosinase-related protein. *Nucleic Acids Res* *18*, 2807-2808.
- Cong, Y., Zhang, Q., Woolford, D., Schweikardt, T., Khant, H., Dougherty, M., Ludtke, S.J., Chiu, W.,

- Decker, H. (2009). Structural Mechanism of SDS-Induced Enzyme Activity of Scorpion Hemocyanin Revealed by Electron Cryomicroscopy. *Structure* 17, 749–758.
- Constabel, C.P., Bergey, D.R., Ryan, C.A. (1995). Systemin activates synthesis of wound-inducible tomato leaf polyphenol oxidase via the octadecanoid defense signaling pathway. *PNAS* 92, 407–411.
- Cuff, M.E., Miller, K.I., van Holde, K.E., Hendrickson, W.A. (1998). Crystal structure of a functional unit from *Octopus* hemocyanin. *J. Mol. Biol.* 278, 855–870.
- Decker, H. und Jaenicke, E. (2004). Recent findings on phenoloxidase activity and antimicrobial activity of hemocyanins. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 673–687.
- Decker, H. und Rimke, T. (1998). Tarantula hemocyanin shows phenoloxidase activity. *J. Biol. Chem.* 273, 25889–25892.
- Decker, H. und Tucek, F. (2000). Tyrosinase/catecholoxidase activity of hemocyanins: structural basis and molecular mechanism. *Trends Biochem. Sci.* 25, 392–397.
- Decker, H. Dillinger, R., Tucek, F. (2000). How does tyrosinase work? Recent insights from model chemistry and structural biology. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39, 1591–1595.
- Decker, H., Ryan, M., Jaenicke, E., Terwilliger, N. (2001). SDS-induced phenoloxidase activity of hemocyanins from *Limulus polyphemus*, *Eurypelma californicum*, and *Cancer magister*. *J. Biol. Chem.* 276, 17796–17799.
- Decker, H., Schweikardt, T., Tucek, F. (2006). The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered? *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 45, 4546–4550.
- Decker, H., Schweikardt, T., Nillius, D., Salzbrunn, U., Jaenicke, E., Tucek, F. (2007). Similar enzyme activation and catalysis in hemocyanins and tyrosinases. *Gene* 398, 183–191.
- Deeth, R.J. und Diedrich, C. (2010). Structural and mechanistic insights into the oxy form of tyrosinase from molecular dynamics simulations. *J. Biol. Inorg. Chem.* 15, 117–129.
- Dirks-Hofmeister, M.E., Inlow, J.K., Moerschbacher, B.M. (2012). Site-directed mutagenesis of a tetrameric dandelion polyphenol oxidase (PPO-6) reveals the site of subunit interaction. *Plant Molecular Biology* 80, 203–217.
- Dirks-Hofmeister, M.E., Kolkenbrock, S., Moerschbacher, B.M. (2013). Parameters that enhance the bacterial expression of active plant polyphenol oxidases. *PLoS ONE* 8, e77291.
- Dirks-Hofmeister, M.E., Singh, R., Leufken, C.M., Inlow, J.K., Moerschbacher, B.M. (2014). Structural diversity in the Dandelion (*Taraxacum officinale*) polyphenol oxidase family results in different responses to model substrates. *PLoS ONE* 9, e99759.
- Dodd, F.E., Hasnain, S.S., Abraham, Z.H., Eady, R.R., Smith, B.E. (1997). Structures of a blue-copper nitrite reductase and its substrate-bound complex. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 53, 406–418.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797.
- Egon, A., Brosius, J., Ptashne, M., (1983). Vectors bearing a hybrid trp-lac promoter useful for

- regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene* 25, 167–178.
- Eicken, C., Krebs, B., Sacchettini, J.C. (1999). Catechol oxidase - structure and activity. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 9, 677–683.
- Festa, R.A. und Thiele, D.J. (2011). Copper: An essential metal in biology. *Curr. Biol.* 21, R877–R883.
- Flurkey, W.H. und Inlow, J.K. (2008). Proteolytic processing of polyphenol oxidase from plants and fungi. *J. Inorg. Biochem.* 102, 2160–2170.
- Fronk, P., Hartmann, H., Bauer, M., Solem, E., Jaenicke, E., Tenzer, S., Decker, H. (2015). Polyphenoloxidase from Riesling and Dornfelder wine grapes (*Vitis vinifera*) is a tyrosinase. *Food Chemistry* 183, 49–57.
- Fuerst, E.P., Okubara, P.A., Anderson, J.V., Morris, C.F. (2014). Polyphenol oxidase as a biochemical seed defense mechanism. *Front. Plant Sci.* 5.
- Fujieda, N., Yabuta, S., Ikeda, T., Oyama, T., Muraki, N., Kurisu, G., Itoh, S. (2013). Crystal structures of copper-depleted and copper-bound fungal pro-tyrosinase: Insights into endogenous cysteine-dependent copper incorporation. *J. Biol. Chem.* 288, 22128–22140.
- Gai, Z., Matsuno, A., Kato, K., Kato, S., Khan, M.R.I., Shimizu, T., Yoshioka, T., Kato, Y., Kishimura, H., Kanno, G. (2015). Crystal structure of the 3.8-MDa respiratory supermolecule hemocyanin at 3.0 Å Resolution. *Structure*.
- Gajera, H.P., Savaliya, D.D., Patel, S.V., Golakiya, B.A. (2015). *Trichoderma viride* induces pathogenesis related defense response against rot pathogen infection in groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Infect. Genet. Evol.* 34, 314–325.
- Gandía-Herrero, F., Jiménez-Atiéndzar, M., Cabanes, J., García-Carmona, F., Escribano, J. (2005). Evidence for a common regulation in the activation of a polyphenol oxidase by trypsin and sodium dodecyl sulfate. *Biol. Chem.* 386, 601–607.
- García-Borrón, J.C. und Solano, F. (2002). Molecular Anatomy of Tyrosinase and its Related Proteins: Beyond the Histidine-Bound Metal Catalytic Center. *Pigment Cell Res.* 15, 162–173.
- Gasparetti, C., Faccio, G., Arvas, M., Buchert, J., Saloheimo, M., Kruus, K. (2010). Discovery of a new tyrosinase-like enzyme family lacking a C-terminally processed domain: production and characterization of an *Aspergillus oryzae* catechol oxidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 213–226.
- van Gastel, M., Bubacco, L., Groenen, E.J.J., Vijgenboom, E., Canters, G.W. (2000). EPR study of the dinuclear active copper site of tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*. *FEBS Letters* 474, 228–232.
- Gaykema, W.P.J., Hol, W.G.J., Vereijken, J.M., Soeter, N.M., Bak, H.J., Beintema, J.J. (1984). 3.2 Å structure of the copper-containing, oxygen-carrying protein *Panulirus interruptus* haemocyanin. *Nature* 309, 23–29
- van Gelder, C.W.G., Flurkey, W.H., Wichers, H.J. (1997). Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* 45, 1309–1323.
- Gerdemann, C., Eicken, C., Galla, H.-J., Krebs, B. (2002a). Comparative modeling of the latent form

- of a plant catechol oxidase using a molluskan hemocyanin structure. *J. Inorg. Biochem.* **89**, 155–158.
- Gerdemann, C., Eicken, C., Krebs, B. (2002b). The crystal structure of catechol oxidase: New insight into the function of type-3 copper proteins. *Acc. Chem. Res.* **35**, 183–191.
- Godden, J., Turley, S., Teller, D., Adman, E., Liu, M., Payne, W., LeGall, J. (1991). The 2.3 angstrom X-ray structure of nitrite reductase from *Achromobacter cycloclastes*. *Science* **253**, 438–442.
- Golbeck, J.H. und Cammarata, K.V. (1981). Spinach thylakoid polyphenol oxidase: Isolation, activation, and properties of the native chloroplast enzyme. *Plant Physiol.* **67**, 977–984.
- Goldfeder, M., Kanteev, M., Adir, N., Fishman, A. (2013). Influencing the monophenolase/diphenolase activity ratio in tyrosinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1834**, 629–633.
- Goldfeder, M., Kanteev, M., Isaschar-Ovdat, S., Adir, N., Fishman, A. (2014). Determination of tyrosinase substrate-binding modes reveals mechanistic differences between type-3 copper proteins. *Nat Commun.* **5**, 4505.
- Gorren, A.C.F., de Boer, E., Wever, R. (1987). The reaction of nitric oxide with copper proteins and the photodissociation of copper-NO complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **916**, 38–47.
- Gowda, L.R. und Paul, B. (2002). Diphenol activation of the monophenolase and diphenolase activities of field bean (*Dolichos lablab*) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1608–1614.
- Greenfield, N. und Fasman, G. (1969). Computed circular dichroism spectra for the evaluation of protein conformation. *Biochemistry* **9**, 4108–4116.
- Hakulinen, N., Gasparetti, C., Kaljunen, H., Kruus, K., Rouvinen, J. (2013). The crystal structure of an extracellular catechol oxidase from the ascomycete fungus *Aspergillus oryzae*. *J. Biol. Inorg. Chem.* **18**, 917–929.
- Halaouli, S., Asther, M., Sigoillot, J.-C., Hamdi, M., Lomascolo, A. (2006). Fungal tyrosinases: New prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 219–232.
- Hazes, B., Kalk, K.H., Hol, W.G.J., Magnus, K.A., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Dauter, Z. (2008). Crystal structure of deoxygenated *Limulus polyphemus* subunit II hemocyanin at 2.18 Å resolution: Clues for a mechanism for allosteric regulation. *Protein Science* **2**, 597–619.
- Hemachandran, H., Anantharaman, A., Mohan, S., Mohan, G., Kumar, D.T., Dey, D., Kumar, D., Dey, P., Choudhury, A., George Priya Doss, C. (2017). Unraveling the inhibition mechanism of cyanidin-3-sophoroside on polyphenol oxidase and its effect on enzymatic browning of apples. *Food Chem.* **227**, 102–110.
- Hu, Y., Wang, Y., Deng, J., Jiang, H. (2016). The structure of a prophenoloxidase (PPO) from *Anopheles gambiae* provides new insights into the mechanism of PPO activation. *BMC Biol.* **14**.
- van Holde, K.E. und Miller, K.I. (1995). Hemocyanins. In *advances in protein chemistry*, (Elsevier), 1–81.

- van Holde, K.E., Miller, K.I., Decker, H. (2001). Hemocyanins and invertebrate evolution. *J. Biol. Chem.* **276**, 15563–15566.
- He, Q., Luo, Y., Chen, P. (2008). Elucidation of the mechanism of enzymatic browning inhibition by sodium chloride. *Food Chem.* **110** 847-851
- Iandolino, A.B., Goes da Silva, F., Lim, H., Choi, H., Williams, L.E., Cook, D.R. (2004). High-quality RNA, cDNA, and derived EST libraries from grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Plant Mol. Biol. Rep.* **22**, 269–278.
- Ismaya, W.T., Rozeboom, H.J., Weijn, A., Mes, J.J., Fusetti, F., Wichers, H.J., Dijkstra, B.W. (2011). Crystal structure of *Agaricus bisporus* mushroom tyrosinase: Identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone. *Biochemistry* **50**, 5477–5486.
- Jackson, I.J. (1994). Evolution and expression of tyrosinase-related proteins. *Pigment Cell Res.* **7** 241–242.
- Jaenicke, E. und Decker, H. (2004). Functional Changes in the family of type 3 copper proteins during evolution. *ChemBioChem* **5**, 163–169.
- Jiménez, M. und García-Carmona, F. (1996). The effect of sodium dodecyl sulphate on polyphenol oxidase. *Phytochemistry* **42**, 1503–1509.
- Kaintz, C., Molitor, C., Thill, J., Kampatsikas, I., Michael, C., Halbwirth, H., Rompel, A. (2014). Cloning and functional expression in *E. coli* of a polyphenol oxidase transcript from *Coreopsis grandiflora* involved in aurone formation. *FEBS Lett.* **588**, 3417–3426.
- Kanade, S.R., Paul, B., Rao, A.G.A., Gowda, L.R. (2006). The conformational state of polyphenol oxidase from field bean (*Dolichos lablab*) upon SDS and acid-pH activation. *Biochem. J.* **395**, 551–562.
- Kang, D., Gho, S.G., Suh, M., Kang, C (2002). Highly Sensitive and Fast Protein Detection with Coomassie Brilliant Blue in Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Bull. Korean Chem. Soc.* **23**, 1511–1512.
- Kanteev, M., Goldfeder, M., Fishman, A. (2015). Structure-function correlations in tyrosinases. *Protein Sci.* **24**, 1360–1369.
- Karban, R., Baldwin, I.T., Baxter, K.J., Laue, G., Felton, G.W. (2000). Communication between plants: Induced resistance in wild tobacco plants following clipping of neighboring sagebrush. *Oecologia* **125**, 66–71.
- Kawabata T., Yasuhara Y., Ochiai M., Matsuura S., Ashida M. (1995). Molecular cloning of insect prophenoloxidase: A copper-containing protein homologous to arthropod hemocyanin. *PNAS* **92**, 7774-7778
- Kenten, R.H. (1957). Latent phenolase in extracts of broad-bean (*Vicia faba* L.) leaves. Activation by acid and alkali. *Biochem. J.* **67**, 300-307.
- King, R.S. und Flurkey, W.H. (1987). Effects of limited proteolysis on broad bean polyphenoloxidase. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **41**, 231–240.
- Kitajima, N., Fujisawa, K. Moro-oka, Y. (1989). μ - η^2 : η^2 -Peroxo Binuclear Copper Complex, $[\text{Cu}(\text{HB}(3,5\text{-iPr}_2\text{pz})_3)_2(\text{O}_2)]$. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 8975-8976.
- Klabunde, T., Eicken, C., Sacchettini, J.C., Krebs, B. (1998). Crystal structure of a plant catechol oxidase

- containing a dicopper center. *Nat. Struct. Biol.* 5, 1084–1090.
- Korbie, D.J. und Mattick, J.S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nat. Protoc.* 3, 1452–1456.
- Koussevitzky, S., Ne’eman, E., Sommer, A., Steffens, J.C., Harel, E. (1998). Purification and properties of a novel chloroplast stromal peptidase: Processing of polyphenol oxidase and other imported precursors. *J. Biol. Chem.* 273, 27064–27069.
- Koussevitzky, S., Ne’eman, E., Peleg, S., Harel, E. (2008). Polyphenol oxidase can cross thylakoids by both the Tat and the Sec-dependent pathways: A putative role for two stromal processing sites. *Physiol. Plant.* 133, 266–277.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lerch, K. (1981). Copper monooxygenases: Tyrosinase and dopamine-monoxygenase. In metal ions in biological systems, Vol. 13 ed. Siegel, H., 143–186, Marcel Dekker, NewYork.
- Linzen, B., Soeter, N., Riggs, A., Schneider, H., Schartau, W., Moore, M., Yokota, E., Behrens, P., Nakashima, H. Takagi, T. (1985). The structure of arthropod hemocyanins. *Science* 229, 519–524.
- Leufken, C.M., Moerschbacher, B.M., Dirks-Hofmeister, M.E. (2015). Dandelion PPO-/PPO-2 domain-swaps: The C-terminal domain modulates the pH optimum and the linker affects SDS-mediated activation and stability. *Biochim. Biophys. Acta* 1854, 178–186.
- Li, Y., Wang, Y., Jiang, H., Deng, J. (2009). Crystal structure of *Manduca sexta* prophenoloxidase provides insights into the mechanism of type 3 copper enzymes. *PNAS* 106, 17002–17006.
- Liang, X., Chen, Q., Lu, H., Wu, C., Lu, F., Tang, J. (2017). Increased activities of peroxidase and polyphenol oxidase enhance cassava resistance to *Tetranychus urticae*. *Exp. Appl. Acarol.* 1-15
- Lieb, B., Altenhein, B., Markl, J., Vincent, A., van Olden, E., van Holde, K.E., Miller, K.I. (2001). Structures of two molluscan hemocyanin genes: Significance for gene evolution. *PNAS* 98, 4546–4551.
- Magnus, K.A., Hazes, B., Ton-That, H., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Hol, W.G. (1994). Crystallographic analysis of oxygenated and deoxygenated states of arthropod hemocyanin shows unusual differences. *Proteins* 19, 302–309.
- Liu, J., Huang, Y., Ding, J., Liu, C., Xiao, X., Ni, D. (2010). Prokaryotic expression and purification of *Camellia sinensis* polyphenol oxidase. *J. Sci. Food Agric.* 90, 2490–2494.
- Ludwig, K. (2014). Einfluss der ortsgerichteten Mutagenese auf die Enzymatik sowie Kristallisationsversuche der Polyphenoloxidase aus der Weinrebe (*Vitis vinifera*). Institut für Molekulare Biophysik, JOGU, Mainz
- Markl, J. (1986). Evolution and function of structurally diverse subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. *Biol. Bull.* 171, 90–115
- Markl, J. (2013). Evolution of molluscan hemocyanin structures. *Biochim. Biophys. Acta* 1834, 1840–1852.
- Martin-Duran, J.M., de Mendoza, A., Sebe-Pedros, A., Ruiz-Trillo, I., Hejnal, A. (2013). A Broad

- genomic survey reveals multiple origins and frequent losses in the evolution of respiratory hemerythrins and hemocyanins. *Genome Biol. Evol.* *5*, 1435–1442.
- Martinez, M.V. und Whitaker, J.R. (1995). The biochemistry and control of enzymatic browning. *Trends Food Sci. Technol.* *6*, 195–200.
- Marusek, C.M., Trobaugh, N.M., Flurkey, W.H., Inlow, J.K. (2006). Comparative analysis of polyphenol oxidase from plant and fungal species. *J. Inorg. Biochem.* *100*, 108–123.
- Mason, H. S. (1948). The chemistry of melanin III. Mechanism of the oxidation of dihydroxyphenylalanine by tyrosinase. *J. Biol. Chem.* *172*, 83-99.
- Masuda, T., Momoji, K., Hirata, T., Mikami, B. (2014). The crystal structure of a crustacean prophenoloxidase provides a clue to understanding the functionality of the type 3 copper proteins. *FEBS Journal* *281*, 2659–2673.
- Matoba, Y., Kumagai, T., Yamamoto, A., Yoshitsu, H., Sugiyama, M. (2006). Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. *J. Biol. Chem.* *281*, 8981–8990.
- Matoba, Y., Bando, N., Oda, K., Noda, M., Higashikawa, F., Kumagai, T., Sugiyama, M. (2011). A molecular mechanism for copper transportation to tyrosinase that is assisted by a metallochaperone, caddie protein. *J. Biol. Chem.* *286*, 30219–30231.
- Mauracher, S.G., Molitor, C., Al-Oweini, R., Kortz, U., Rompel, A. (2014). Latent and active *ab*PP04 mushroom tyrosinase cocrystallized with hexatungstotellurate(VI) in a single crystal. *Acta Cryst. D* *70*, 2301–2315.
- Mayer, A.M. (2006). Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. *Phytochemistry* *67*, 2318–2331.
- Mayer, A.M. und Harel, E. (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry* *18*, 193–215.
- McGrath, A.P., Mithieux, S.M., Collyer, C.A., Bakhuis, J.G., van den Berg, M., Sein, A., Heinz, A., Schmelzer, C., Weiss, A.S. Guss, J.M. (2011). Structure and Activity of *Aspergillus nidulans* Copper Amine Oxidase. *Biochemistry* *50*, 5718–5730.
- Mogol, B. A., Yildirim, A., Gökmen, V. (2010) Inhibition of enzymatic browning in actual food systems by the maillard reaction products. *J. Sci. Food Agric.* *90* 2556-2562.
- Molitor, C., Mauracher, S.G., Rompel, A. (2016). Aurone synthase is a catechol oxidase with hydroxylase activity and provides insights into the mechanism of plant polyphenol oxidases. *PNAS* *113*, E1806–E1815.
- Monzani, E., Quinti, L., Perotti, A., Casella, L., Gullotti, M., Randaccio, L., Geremia, S., Nardin, G., Faleschini, P., Tabbi, G. (1998). Tyrosinase models. Synthesis, structure, catechol oxidase activity, and phenol monooxygenase activity of a dinuclear copper complex derived from a triamino pentabenzimidazole ligand. *Inorg. Chem.* *37*, 553–562.
- Morrison R., Mason K., Frost-Mason S. (1994). A cladistic analysis of the evolutionary relationships of the members of the tyrosinase gene family using sequence data. *Pigment Cell Res.* *7*, 388–393.

- Müller, W.E.G., Perović, S., Schröder, H.C., Breter, H.J. (2004). Oxygen as a morphogenic factor in sponges: Expression of a tyrosinase gene in the sponge *Suberites domuncula*. *Micron* 35, 87–88.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51, 263–273.
- Muñoz, J.L., García-Molina, F., Varón, R., Rodríguez-Lopez, J.N., García-Cánovas, F., Tudela, J. (2006). Calculating molar absorptivities for quinones: Application to the measurement of tyrosinase activity. *Anal. Biochem.* 351, 128–138.
- Naish, S., Cooksey, C.J., Riley, P.A. (1988). Initial mushroom tyrosinase-catalysed oxidation product of 4-hydroxyanisole is 4-methoxy-*ortho*-benzoquinone. *Pigment Cell Res.* 1, 379–381.
- Naish-Byfield, S. und Riley, P.A. (1992). Oxidation of monohydric phenol substrates by tyrosinase. An oximetric study. *Biochem J.* 288, 63–67.
- Nar, H., Messerschmidt, A., Huber, R., van de Kamp, M., Canters, G.W. (1991). Crystal structure analysis of oxidized *Pseudomonas aeruginosa* azurin at pH 5.5 and pH 9.0. *J. Mol. Biol.* 221, 765–772.
- Naresh, K.N., Sreekumar, A., Rajan, S.S. (2015). Structural insights into the interaction between molluscan hemocyanins and phenolic substrates: An *in silico* study using docking and molecular dynamics. *J. Mol. Graph. Model.* 61, 272–280.
- Nicolas, J.J., Richard-Forget, F.C., Goupy, P.M., Amiot, M., Aubert, S.Y. (1994). Enzymatic browning reactions in apple and apple products. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 34, 109–157.
- Olivares, C. und Solano, F. (2009). New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell Melanoma Res.* 22, 750–760.
- Olivares, C., García-Borrón, J.C., Solano, F. (2002). Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry* 41, 679–686.
- Perbandt, M., Guthöhrlein, E.W., Rypniewski, W., Idakieva, K., Stoeva, S., Voelter, W., Genov, N., Betzel, C. (2003). The structure of a functional unit from the wall of a gastropod hemocyanin offers a possible mechanism for cooperativity. *Biochemistry* 42, 6341–6346.
- Pérez-Gilabert, M. und García Carmona, F. (2000). Characterization of catecholase and cresolase activities of eggplant polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* 48, 695–700.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera? A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* 25, 1605–1612.
- Ramsden, C.A. und Riley, P.A. (2014). Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation, *Bioorg. Med. Chem.* 22, 2388–2395.
- Rescigno, A., Sollai, F., Pisu B., Rinaldi, A., Sanjust, E. (2002). Tyrosinase inhibition: General and applied aspects. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 17, 207–218
- Robinson, S.P. und Dry, I.B. (1992). Broad bean leaf polyphenol oxidase is a 60-kilodalton

- protein susceptible to proteolytic cleavage. *Plant Physiol.* **99**, 317–323.
- Rolff, M., Schottenheim, J., Decker, H., Tuczec, F. (2011). Copper-O₂ reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: Molecular mechanism and comparison with the enzyme. *Chem Soc Rev* **40**, 4077–4098.
- Saeidian, S., Keyhani, E., Keyhani, J. (2007). Effect of ionic detergents, nonionic detergents, and chaotropic agents on polyphenol oxidase activity from dormant saffron (*Crocus sativus* L.) corms. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 3713–3719.
- Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analyses for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354
- Šali, A., und Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **234**, 779-815..
- Sánchez-Ferrer, Á., Neptuno Rodríguez-López, J., García-Cánovas, F., García-Carmona, F. (1995). Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys Acta.* **1247**, 1–11.
- See, Y. und Jackowski, G. (1989). Estimating molecular weights of polypeptides by SDS gel electrophoresis. *Protein structure - A practical approach*. IRL Press, Oxford, 1-22
- Selinheimo, E., NiEidhin, D., Steffensen, C., Nielsen, J., Lomascolo, A., Halaouli, S., Record, E., O’Beirne, D., Buchert, J., Kruus, K. (2007). Comparison of the characteristics of fungal and plant tyrosinases. *Journal of Biotechnology* **130**, 471–480.
- Sendovski, M., Kanteev, M., Ben-Yosef, V.S., Adir, N., Fishman, A. (2011). First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *J. Mol. Biol.* **405**, 227–237.
- Söderhäll, K. und Cerenius, L. (1998). Role of the prophenoloxidase-activating system in invertebrate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **10**, 23–28.
- Solem, E., Tuczec, F., Decker, H. (2016). Tyrosinase versus catechol oxidase: One asparagine makes the difference. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **55**, 2884–2888.
- Solomon, E.I., Heppner, D.E., Johnston, E.M., Ginsbach, J.W., Cirera, J., Qayyum, M., Kieber-Emmons, M.T., Kjaergaard, C.H., Hadt, R.G., Tian, L. (2014). Copper Active sites in biology. *Chem. Rev.* **114**, 3659–3853.
- Sommer, A., Ne’eman, E., Steffens, J.C., Mayer, A.M., Harel, E. (1994). Import, targeting, and processing of a plant polyphenol oxidase. *Plant Physiol.* **105**, 1301–1311.
- Steffens, J.C., Harel, E., Hunt, M.D. (1994). Polyphenol oxidase. In *genetic engineering of plant secondary metabolism*, B.E. Ellis, G.W. Kuroki, H.A. Stafford, eds. (Boston, MA: Springer US), 275–312.
- Studier, F.W. (2005). Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**, 207–234.
- Sugumaran, M. (1991). Molecular mechanisms for mammalian melanogenesis comparison with insect cuticular sclerotization. *FEBS Letters* **293**, 4–10.
- Sugumaran, M. (2002). Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of

- phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res.* *15*, 2–9.
- Sullivan, M.L., Hatfield, R.D., Thoma, S.L., Samac, D.A. (2004). Cloning and characterization of red clover polyphenol oxidase cDNAs and expression of active protein in *Escherichia coli* and transgenic alfalfa. *Plant Physiol.* *136*, 3234–3244.
- Tepper, A.W.J.W., Bubacco, L., Canters, G.W. (2005). Interaction between the type-3 copper protein tyrosinase and the substrate analogue *p*-nitrophenol studied by NMR. *J. Am. Chem. Soc.* *127*, 567–575.
- Tolbert, N.E. (1973). Activation of polyphenol oxidase of chloroplasts. *Plant Physiol.* *51*, 234–244.
- Toussaint, O. und Lerch, K. (1987). Catalytic oxidation of 2-aminophenols and *ortho* hydroxylation of aromatic amines by tyrosinase. *Biochemistry* *26*, 8567–8571.
- Tsukamoto, K., Jackson, I.J., Urabe, K., Montague P.M., Hearing V.J. (1992). A second tyrosinase related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPAchrome tautomerase. *EMBO J.* *11*, 519–526.
- Tran, L.T., Taylor, J.S., Constabel, C. (2012). The polyphenol oxidase gene family in land plants: Lineage-specific duplication and expansion. *BMC Genom.* *13*, 395.
- Virador, V.M., Reyes Grajeda, J.P., Blanco-Labra, A., Mendiola-Olaya, E., Smith, G.M., Moreno, A., Whitaker, J.R. (2010). Cloning, sequencing, purification, and crystal structure of Grenache (*Vitis vinifera*) polyphenol oxidase. *J. Agric. Food Chem.* *58*, 1189–1201.
- Volbeda, A. und Hol, W. (1989). Crystal Structure of Hexameric Haemocyanin from *Panulirus interruptus* Refined at 3.2 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* *209*, 249–279
- Weijn, A., Bastiaan-Net, S., Wichers, H.J., Mes, J.J. (2013). Melanin biosynthesis pathway in *Agaricus bisporus* mushrooms. *Fungal Genet. Biol.* *55*, 42–53.
- Wilcox, D.E., Porras, A.G., Hwang, Y.T., Lerch, K., Winkler, M.E., Solomon, E.I. (1984). Substrate analogue binding to the coupled binuclear copper active site in tyrosinase. *J. Am. Chem. Soc.* *4015–4027*.
- Wu, Y.-L., Pan, L.-P., Yu, S.-L., Li, H.-H. (2010). Cloning, microbial expression and structure–activity relationship of polyphenol oxidases from *Camellia sinensis*. *J. Biotechnol.* *145*, 66–72.
- Yoruk, R. und Marshall, M.R. (2003). Physicochemical properties and function of plant polyphenol oxidase: A review. *J. Food Biochem.* *27*, 361–422.
- Zekiri, F., Molitor, C., Mauracher, S.G., Michael, C., Mayer, R.L., Gerner, C., Rompel, A. (2014). Purification and characterization of tyrosinase from walnut leaves (*Juglans regia*). *Phytochemistry* *101*, 5–15.

G Anhang

Abkürzungen

1.1 Allgemeine Abkürzungen

Tab.26 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

μ	mikro
λ	Wellenlänge [nm]
AS	Aminosäure
bidest.	bidestilliert
BLAST	engl. <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
kDa	Kilodalton
dATP	Deoxyadenosin-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Dideoxyribonucleosid-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dest.	destilliert
DNA	Desoxyribonucleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Deoxyribonucleosid-5'-triphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA (engl. <i>double strand DNA</i>)
dTTP	Deoxythymidin-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid (3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenantridiniumbromid)
fwd	forward
CD	Circulardichroismus
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>
g	Erdbeschleunigung [9,81 m/s ²]
g	Gramm

H ₂ O	Wasser
VE-H ₂ O	vollentsalztes Wasser
H ₂ O _{dest}	destilliertes Wasser
h	Stunde(n)
kb	Kilobase (1000 Nukleotide)
kDa	Kilodalton, [10 ³ Dalton]
LB	engl. <i>lysogeny broth</i>
m	Milli-
M	Molar [mol/l]
MCS	engl. <i>multiple cloning site</i>
min	Minute(n)
mM	Milimolar
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
Ori	Replikationsori (engl. <i>origin of replication</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PPO	Polyphenoloxidase
rev	engl. <i>reverse</i>
RMSD	engl. <i>root-mean-square deviation</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	reverse transcriptase PCR
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat

ssDNA	einzelsträngige DNA (single strand DNA)
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE-Puffer	TRIS-Borat-EDTA Puffer
TBS-Puffer	engl. <i>Tris-buffered saline</i>
TBST-Puffer	engl. <i>Tris-buffered with Tween20</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _m	DNA-Schmelztemperatur
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Enzymeinheit
UV	Ultraviolett
V	Volt
% w/v	Massenprozent
% v/v	Volumenprozent
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid

1.2 IUPAC-Code der Nukleinsäuren

Tab 27: Liste des IUPAC-Codes der Nukleinsäuren

Code	Nukleobasen
A	Adenin
G	Guanin
C	Cytosin
T	Thymin
U	Uracil

1.3 Abkürzungen und IUPAC-Code der Aminosäuren

Tab 27: Liste der Abkürzungen und des IUPAC-Codes der Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchtaben-code	Einbuchstaben-code	Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstaben-code
Alanin	Ala	A	Leucin	Leu	L
Arginin	Arg	R	Lysin	Lys	K
Asparagin	Asn	N	Methionin	Met	M
Aspartat	Asp	D	Phenylalanin	Phe	F
Cystein	Cys	C	Prolin	Pro	P
Glutamat	Glu	E	Serin	Ser	S
Glutamin	Gln	Q	Threonin	Thr	T
Glycin	Gly	G	Tryptophan	Trp	X
Histidin	His	H	Tyrosin	Tyr	Y
Isoleucin	Ile	I	Valin	Val	V

1.4 Verwendete PPO-Abkürzungen

Tab 28: Liste der verwendeten PPO-Abkürzungen

Abkürzungen der PPOs	Gattungs- und Artnamen	Accession-Nummern
AcPPO	<i>Ananas comosus</i>	AAK29782
AtPPO	<i>Aegilops tauschii</i>	EMT06707
CgAUS1	<i>Coreopsis grandiflora</i>	4Z13_A
CcPPO	<i>Cajanus cajan</i>	XM_020365958
BdPPO	<i>Brachypodium distachyon</i>	XP_003567194
EgPPO-1	<i>Elaeis guineensis</i>	XP_010910928
EgPPO-2	<i>Elaeis guineensis</i>	XP_010926766
IbCO-1	<i>Ipomoea batatas</i>	CAC83609; 1BT3_A
IbCO-2	<i>Ipomoea batatas</i>	AAW78869

Abkürzungen der PPOs	Gattungs- und Artnamen	Accession-Nummern
JrPPO	<i>Juglans regia</i>	5CE9_A
OsPPO	<i>Oryza sativa</i>	CAE03510
PdPPO	<i>Phoenix dactylifera</i>	XP_008778193
SbPPO	<i>Sorghum bicolor</i>	KXG20368
SiPPO	<i>Setaria italica</i>	KQL11410
SlPPO	<i>Solanum lycopersicum</i>	Q08296
SoPPO	<i>Spinacia oleracea</i>	P43310
StPPO	<i>Solanum tuberosum</i>	AAA85121
TaPPO	<i>Triticum aestivum</i>	AAT06523
ToPPO-2	<i>Taraxacum officinale</i>	3WFP2
ToPPO-3	<i>Taraxacum officinale</i>	CBZ41490
TpPPO	<i>Trifolium pratense</i>	AAK13244
VfPPO	<i>Vicia faba</i>	Q06215
VaPPO	<i>Vigna angularis</i>	XP_017434835
VvPPOg	<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Grenache	U83274
L-VvPPOcs-3	<i>Vitis vinifera</i> L. cv. Cabernet Sauvignon	KT381013
ZmPPO	<i>Zea mays</i>	AFW87458

1.5 Verzeichnis der verwendeten Kristallstrukturen

Tab 29: Verzeichnis der verwendeten Kristallstrukturen von Typ-3 Kupferproteinen aus der PDB-Datenbank

PDB-ID	Protein	Gattungs- und Artnamen	Auflösung [Å]	R-Free	TY/CO	Publikation
3NM8	TYBm	<i>Bacillus megaterium</i>	2,0	0,273	TY	Sendovski et al., 2010
4HD7	TYBm	<i>Bacillus megaterium</i>	2,1	0,282	TY	Goldfeder et al., 2013
4HD6	TYBm	<i>Bacillus megaterium</i>	2,0	0,277	TY	Goldfeder et al., 2013
4P6R	TYBm	<i>Bacillus megaterium</i>	2,2	0,241	TY	Goldfeder et al., 2014
4P6S	TYBm	<i>Bacillus megaterium</i>	2,2	0,222	TY	Goldfeder et al., 2014
4P6T	TYBm	<i>Bacillus megaterium</i>	2,5	0,261	TY	Goldfeder et al., 2014
2ZMX	TYSc	<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	1,3	0,213	TY	Matoba et al., 2009
3AWU	TYSc	<i>Streptomyces castaneoglobisporus</i>	1,2	0,175	TY	Matoba et al., 2009
2P3X	VvPPOg	<i>Vitis vinifera</i>	2.2	0,252	CO/TY	Virador et al., 2010
5CE9	JrPPO	<i>Juglans regia</i>	1.8	0,188	TY	Bijelic et al., 2015
1BT1	IbCO-1	<i>Ipomoea batatas</i>	2,7	0,256	CO	Klabunde et al., 1998
4Z12	CgAUS1	<i>Coreopsis grandiflora</i>	1,9	0,205	CO/TY	Molitor et al., 2015
3W6W	melB	<i>Aspergillus oryzae</i>	1,4	0,199	TY	Fujieda et al., 2013

4J3R	AoCO-4	<i>Aspergillus oryzae</i>	2,2	0,222	CO	Hakulinen et al., 2013
2Y9W	AbPPO-3	<i>Agaricus bisporus</i>	2,3	0,237	TY	Ismaya et al., 2011
4OUA	AbPPO-4	<i>Agaricus bisporus</i>	2,8	0,228	TY	Mauracher et al., 2014
1LLA	LpHC	<i>Limulus polyphemus</i>	2,2	n/a	-	Hazes et al., 1994 Modified: 2009
1NOL	LpHC	<i>Limulus polyphemus</i>	2,4	n/a	-	Hazes et al., 1996 Modified: 2009
1OXY	LpHC	<i>Limulus polyphemus</i>	2,4	n/a	-	Magnus et al., 1994
1HCY	PiHC	<i>Panulirus interruptus</i>	3,2	n/a	-	Volbeda and Hol., 1994
1JS8	OdHC	<i>Enteractopus dofleini</i>	2,3	0,262	-	Cuff et al., 2001
3HHS	MspPO	<i>Manduca sexta</i>	2,0	0.194	TY	Li et al., 2009
4YZW	AgpPO	<i>Anopheles gambiae</i>	2,6	0,233	TY	Hu et al., 2016
3WKY	MjpPO	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	1,8	0,196	TY	Masuda et al., 2014

2. Verwendete Primer

Tab 29: Verzeichnis der verwendeten Primer

Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Orientierung		T _m [°C]	Modifikation
Genspezifische Primer					
VvT_SP_for	ATGGCTTCTTTGCCTTGGT	forward	19	54,5	-
VvT_16_for	GCTCCCATCCAGGCAC	forward	16	56,9	-
BamH1_CU3_for	GGATCCGGCTCCCATCCAGGCAC	forward	23	69,6	-
VvT_25_stop_rev	ATCGGAAACAACTCGATCTCAATT	reverse	25	58,1	-
VvT_LP_rev	CTCTTCTCATCCTCTTTCT	reverse	20	55,3	-
VvT_LP_stop_rev	TCACTTCTCATCCTCTTTCT	reverse	23	58,9	-
VvT-C_stop_rev	TTATGGTAGCCATGGAATAGGA	reverse	22	56,5	-

Bezeichnung	Primersequenz (5'-3')	Orientierung		T _m [°C]	Modifikation
Vektorspezifische Primer					
T7_Promoter	TAATACGACTCACTATAGGG	forward	20	47,5	-
T7_Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	reverse	19	53,4	-
SP6	ATTTAGGTGACTATAG	reverse	18	42,1	-
M13_for	GTA AACGACG GCCAGT	forward	17	52,6	-
M13_rev	CAGGAAACAGCTATGAC	reverse	17	47,0	-
Genspezifische Primer für die Fusionierung des Strep-Tag II					
VvT_EK_I_for	ATGACGACGACAAGGCTCCCAT	forward	22	60,7	-
Strepl_for	CGAAAAGGCAGATGACGACGA	forward	21	57,5	-
Strepll_for	ACCCGAGTTCGAAAAGGCA	forward	20	60,0	-
StreplV_for	TGGAGCCACCCGAGTTCGAAAAGGCA	forward	27	67,8	-
Primer für die Mutagenese (L-VvPPOcs-2)					
VvT_F259G_for	P-GGACATGGGAAACGGCTATACTGCCGG	forward	27	64,5	5'-POH
VvT_F259L_for	P-GGACATGGGAAACGCTATACTGCCGG	forward	27	62,4	5'-POH
VvT_F259V_for	P-GGACATGGGAAACTGTATACTGCCGG	forward	27	61,0	5'-POH
VvT_Mut2_rev	P-TCACTAGGCTTATCAGCAAGACCAGTC	reverse	27	59,7	5'-POH
Primer für die Mutagenese (L-VvPPOcs-3)					
G241N_for	CCACATAATCCAGTCCACATATGGGAC	forward	27	58,8	-
G241N_rev	GACTGGATTATGTGGGACGTTCTC	reverse	24	57,1	-
G241N/P242I_for	CATAATATTGTCCACATATGGACTGGAC	forward	28	55,3	-
G241N/P242I_rev	GTGGACAATATTATGTGGGACGTTTC	reverse	27	55,3	-
P239del/G241N/P242I_for	CATAATATTGTCCACATATGGACTGGAC	forward	28	55,3	-
P239del/G241N/P242I_rev	GTGGACAATATTATGGACGTTCTCAATG	reverse	28	55,9	-

3. Internetadressen

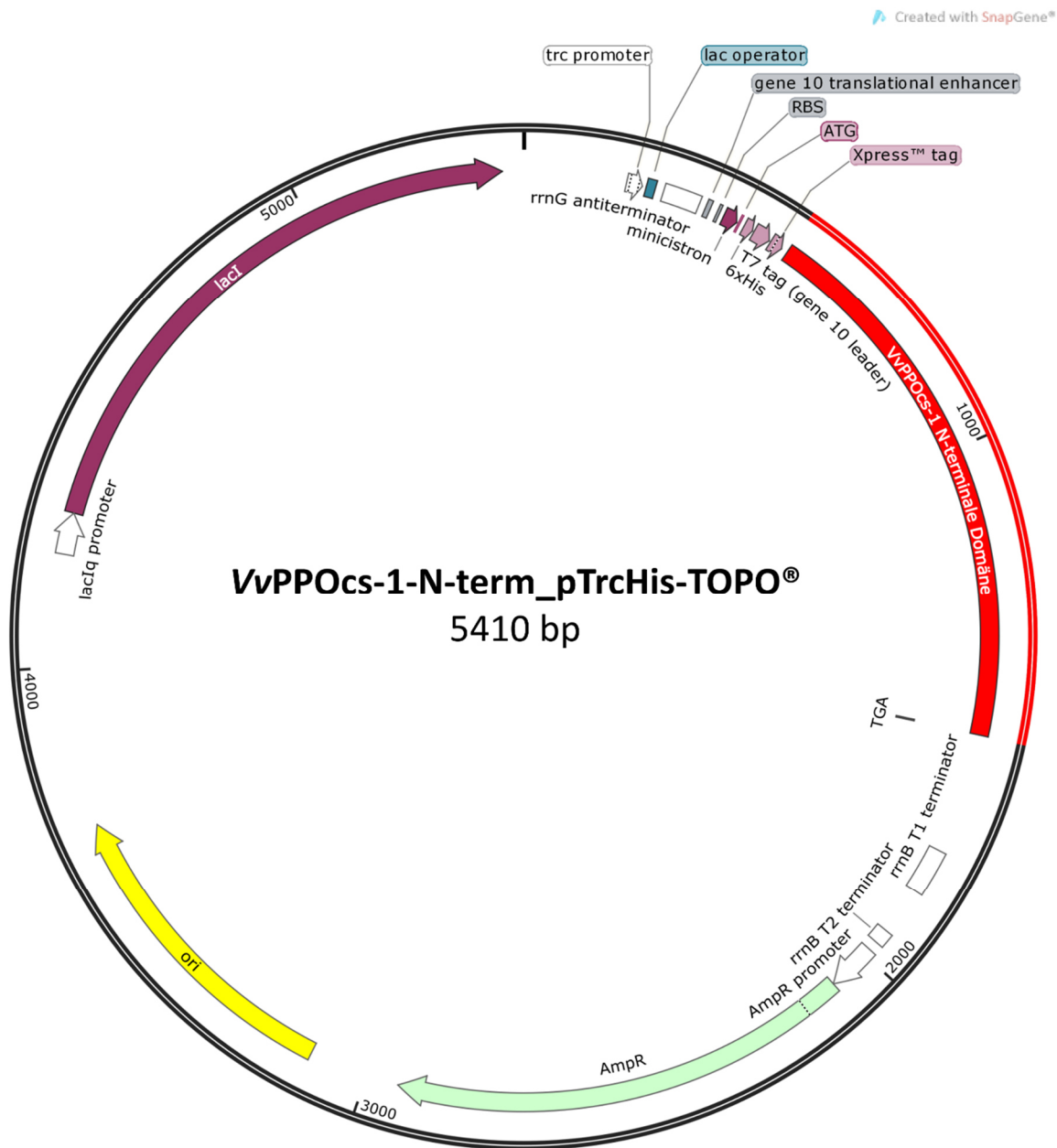
Tab 30: Verzeichnis der verwendeten Internetadressen

Programm	Internetadresse
BioEdit	https://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html
BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)	https://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
ClustalW	https://www.clustal.org/
Double Digest Finder	https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder
EMBL InterProScan	https://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan5/
ExPASy PROSITE Scan	https://www.prosite.expasy.org/
GeneDoc	https://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/
Geneious	https://www.geneious.com/
MEGA 6	https://www.megasoftware.net/
Modeller 9.15	https://www.salilab.org/archives/modeller_usage/2014/msg00023.html
My Hits Motif Scan	https://www.myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan

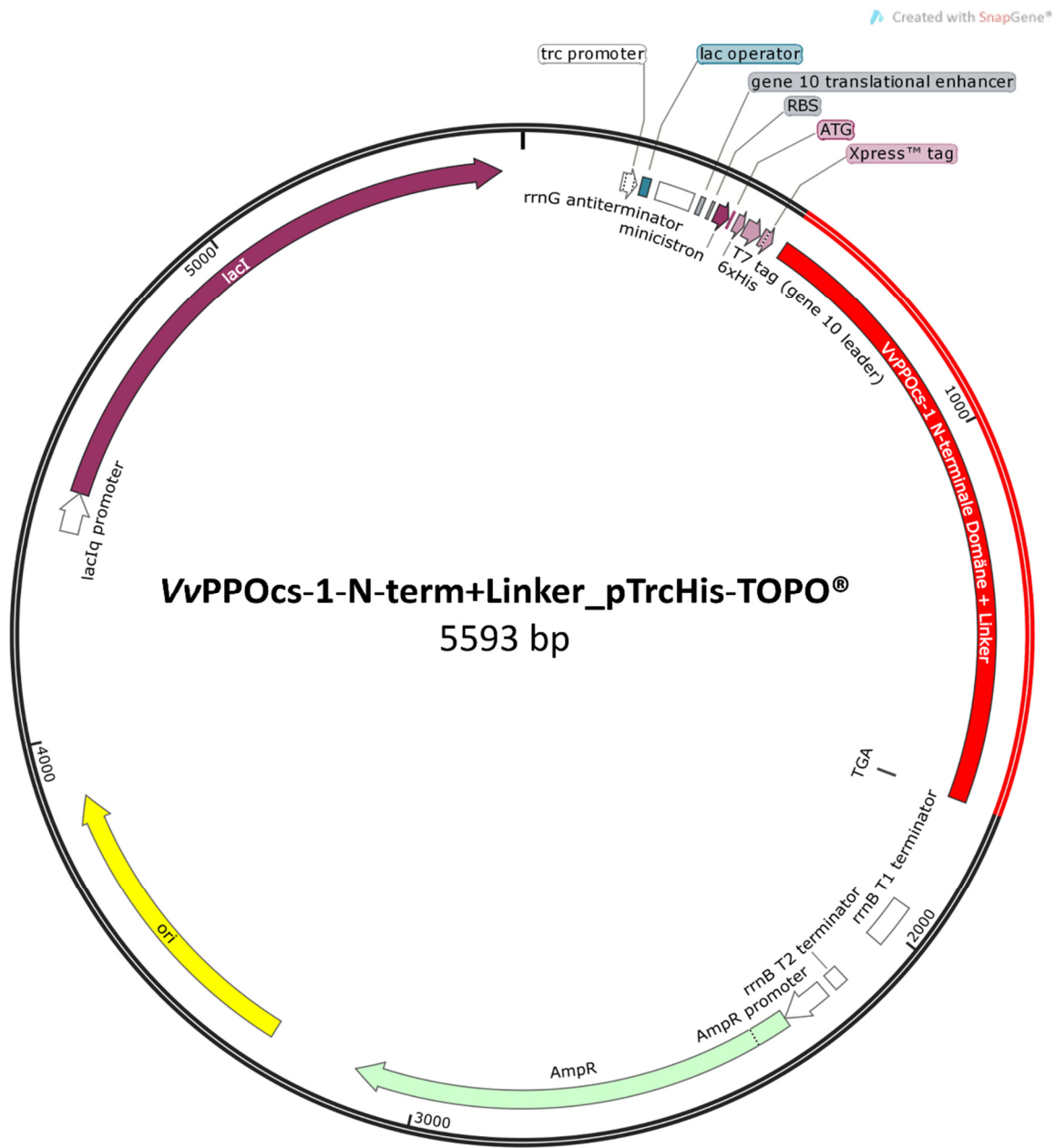
Programm	Internetadresse
NCBI (National Center for Biotechnology Information)	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/
NEBcutter V2.0	https://www.tools.neb.com/NEBcutter2/
Oligo Analyzer	https://www.eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/
Primer3	https://www.primer3.ut.ee/
ProtParam	http://web.expasy.org/protparam/
Translate ExpASy	https://www.expasy.org/translate/
SnapGene (<i>trial</i> Version)	http://www.snapgene.com/products/snapgene/free_trial/
UCSF Chimera	https://www.cgl.ucsf.edu/chimera

4. Vektorkarten der verwendeten Expressionskonstrukte

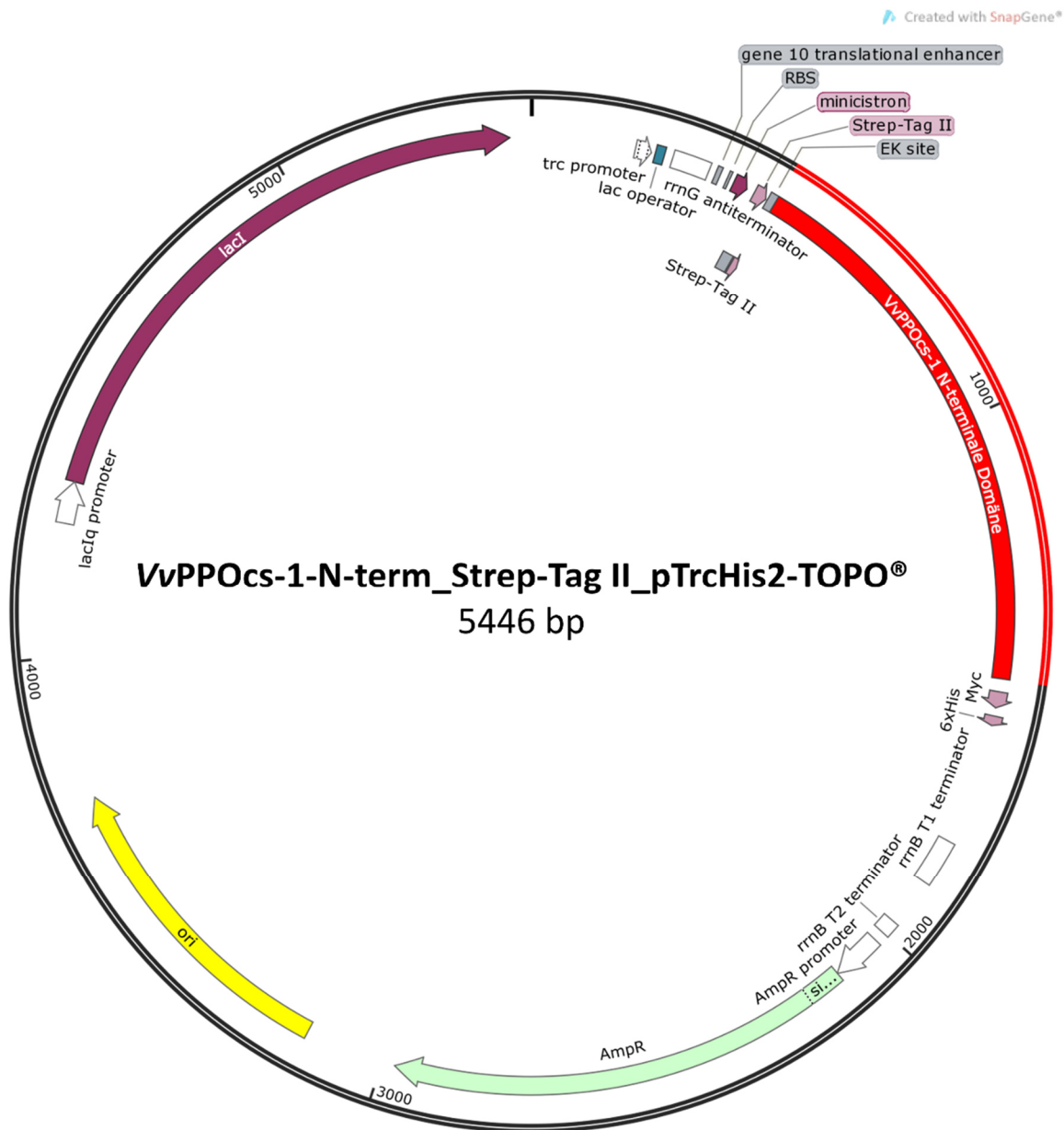
4.1 Vektorkarte des VvPPOcs-1-N-term_pTrcHis-Konstrukts



4.2 Vektorkarte des VvPPOcs-1-N-term + Linker_pTrcHis-Konstrukts

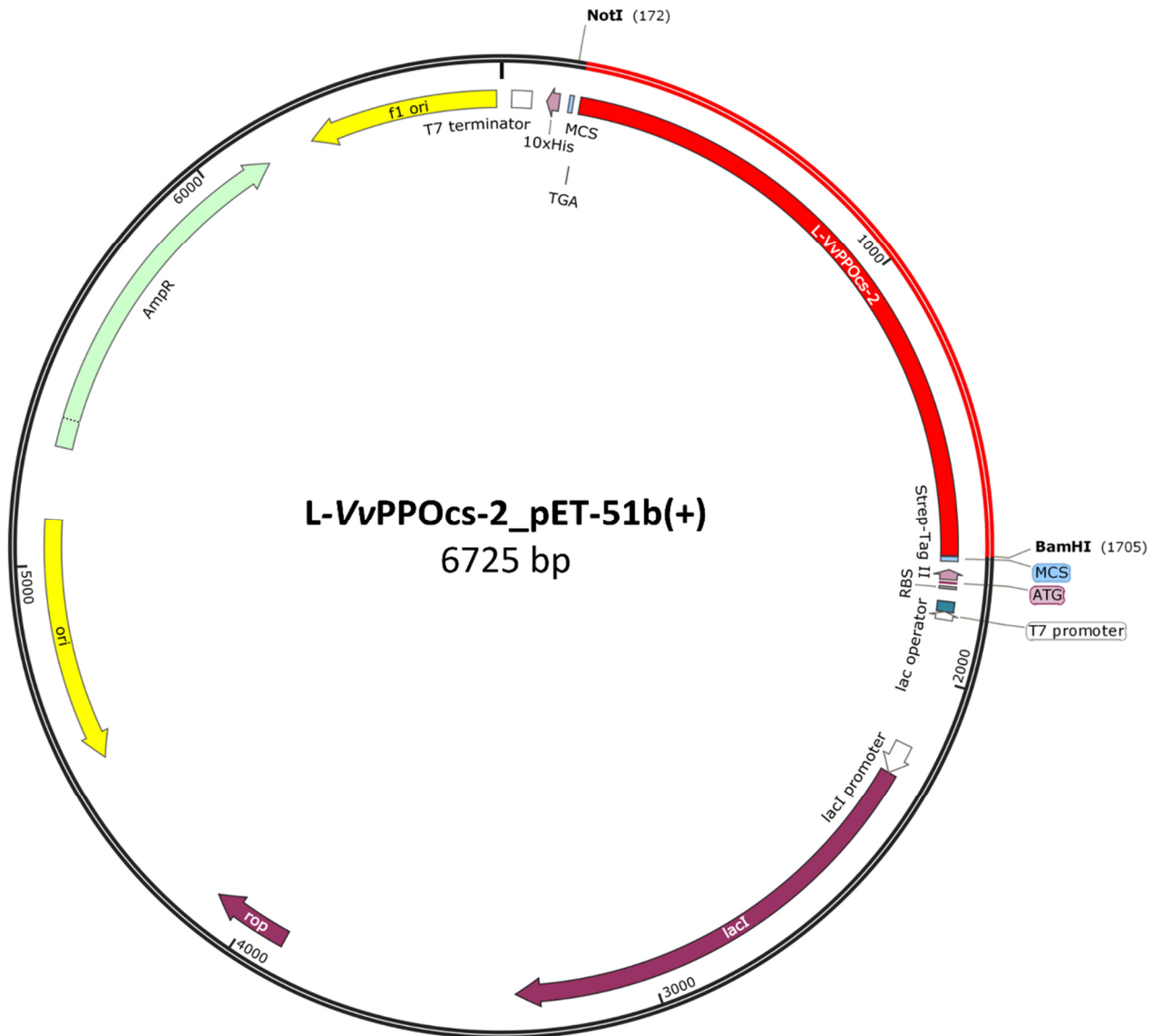


4.3 Vektorkarte des VvPPOcs-1-N-term_Strep-Tag II_pTrcHis2-Konstrukts



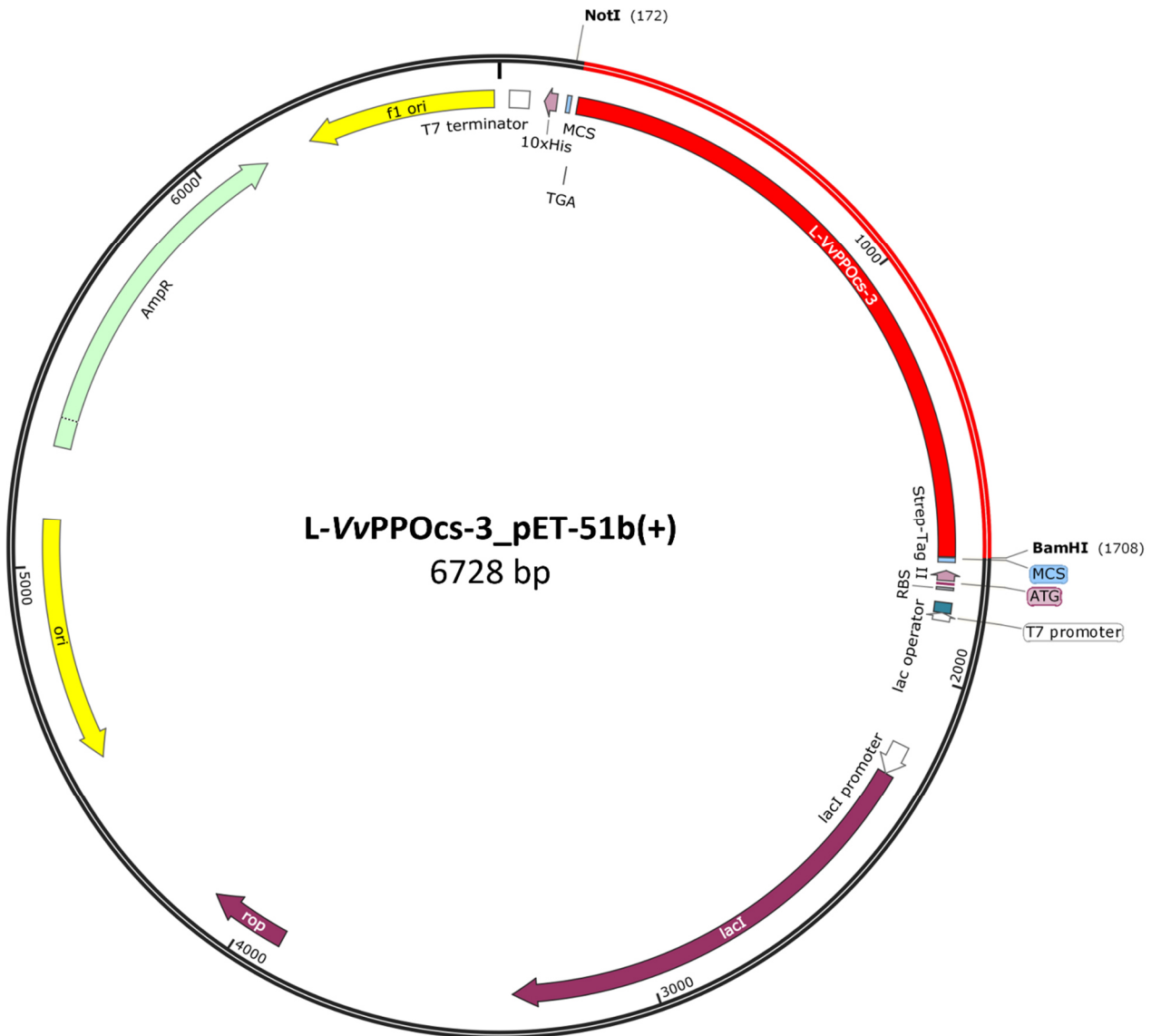
4.4 Vektorkarte des L-VvPPOcs-2_pET-51b(+)-Konstrukts

Created with SnapGene®



4.5 Vektorkarte des L-VvPPOcs-3_pET-51b(+)-Konstrukts

Created with SnapGene®



Danksagung

Mein ausdrücklicher Dank gilt zunächst meinem Doktorvater [REDACTED] für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie die Überlassung des interessanten und spannenden Themas. Durch seinen persönlichen Einsatz hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Des Weiteren danke ich vielmals Herrn [REDACTED] für die vielen wissenschaftlichen Anregungen und seine Zusammenarbeit bei unserer Publikation.

Ein ganz besonderer Dank gebührt [REDACTED] für die Übernahme meiner Zweitkorrektur und der umfangreichen Unterstützung. Seine konstruktive Kritik und sein Engagement besonders in der Endphase meiner Arbeit, waren für mich eine große Bereicherung. Zudem bedanke ich mich ganz herzlich für seine wertvolle Beratung und die kritische Durchsicht und Korrektur dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. [REDACTED] danke ich auch ganz ausdrücklich für die großzügige Bereitstellung seiner Laborbereiche und Materialien sowie die hervorragenden Arbeitsbedingungen in seiner Arbeitsgruppe am Institut für Physiologische Chemie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz. Hier habe ich mich zu jeder Zeit sehr willkommen gefühlt und konnte mich dank des außergewöhnlich freundschaftlichen und kollegialen Arbeitsklimas, experimentell völlig frei entfalten. Dies war für mich eine einmalige Erfahrung und wird mir für lange Zeit in Erinnerung bleiben. An dieser Stelle möchte ich mich auch ganz herzlich bei Herrn [REDACTED] bedanken, der mich in wissenschaftlichen Fragen im Bereich der Molekularbiologie stets kompetent beraten hat. Ein großer Dank geht natürlich auch an die gesamte Arbeitsgruppe.

Herrn [REDACTED] und Herrn [REDACTED] danke ich für die Betreuung im Rahmen des Graduiertenkollegs 1043. Hier sei auch ein ausdrücklicher Dank an die DFG gerichtet.

Weiterer Dank geht an Frau Dr. [REDACTED] und Herrn Prof. Dr. [REDACTED] aus Münster für die freundliche Unterstützung bei der rekombinanten Expression sowie den Expertisen im Bereich der Proteinreinigung.

Meinen lieben Freunden und Arbeitskollegen möchte ich selbstverständlich auch meinen Dank aussprechen. Insbesondere danke ich [REDACTED] für ihre Geduld und ihr Vertrauen. [REDACTED] für die umfangreiche Hilfe bei Formatierungsproblemen und natürlich auch für die vielen schönen Stunden, die wir zusammen verbracht haben. Allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Decker und Markl möchte ich mich für ihre Hilfsbereitschaft und die vielen Anregungen und Tipps bedanken. Unvergesslich bleiben natürlich auch die zahlreichen Grillabende.

Ein ganz spezielles Dankeschön gilt meinen Eltern, die mir diese Arbeit ermöglicht haben. Insbesondere danke ich meiner Mutter für das Korrekturlesen und die moralische Unterstützung.

Lebenslauf

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

[REDACTED]

Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit Hilfe der angegebenen Personen und Hilfsmittel (Literatur, Apparaturen, Material) angefertigt zu haben. Bei den von mir durchgeführten Experimenten habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Johannes Gutenberg-Universität Mainz niedergelegt sind, eingehalten.

Ort, Datum

Even Solem