
**Charakterisierung der Vinorin-Synthase aus
Rauvolfia serpentina durch Reinigung, Expression,
Mutation und Kristallisation**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

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

Anja Bayer
geb. in Rüsselsheim
Mainz 2003

Tag der mündlichen Prüfung: 18.07.2003

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG	1
1	Gewinnung und Charakterisierung von Proteinen	1
2	Strukturaufklärung durch Kristallisation	4
3	<i>Rauvolfia serpentina</i> – Biosynthese von Ajmalin	5
4	Die Rolle der Vinorin-Synthase als Acetyltransferase.....	10
5	Ziel der Arbeit.....	12
II	MATERIAL	13
1	Biologisches Material	13
1.1	Pflanzliche Zellkulturen	13
1.2	Bakterienstämme	13
2	Puffer	14
3	Säulenmaterialien, Leersäulen und Fertigsäulen.....	14
4	Verwendete Vektoren	15
5	Enzyme und Zubehör für die Molekularbiologie	15
6	Kits für die Molekularbiologie und Kristallisation.....	16
7	Spezielle Chemikalien und Zubehör.....	16
8	Geräte	17
III	METHODEN	20
1	Proteinreinigung	20
1.1	Präparation von Enzymrohextrakten aus Pflanzenzellen.....	20
1.2	Präparation von Enzymrohextrakten aus Bakterienzellen	21
1.3	Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall.....	21
1.4	Ammoniumsulfatfällung.....	21

1.5 Dialyse	22
1.6 Konzentrieren von Proteinlösungen	22
1.7 Elektrophoretische Methoden	23
1.8 Gehaltsbestimmung von Proteinlösungen	27
1.9 Chromatographische Methoden.....	28
2 Bestimmung der Enzymaktivität.....	31
3 Chromatographische und spektroskopische Methoden	32
3.1 Dünnschichtchromatographie	32
3.2 Massenspektrometrie zur Identifizierung des Enzymprodukts	33
3.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)	33
4 Molekularbiologische Methoden	34
4.1 Nucleinsäure-Isolierung	34
4.2 Elektrophorese von Nucleinsäuren	36
4.3 Amplifizieren von Nucleinsäuren.....	37
4.4 Klonieren von cDNA-Fragmenten	40
5 Kristallisation	44
5.1 Selenomethionin-Methode	44
III ERGEBNISSE	46
1 Nachweis der Vinorin-Synthase	46
1.1 Enzymassay der Vinorin-Synthase	46
2 Reinigung der Vinorin-Synthase	49
2.1 Aufschluss der <i>Rauvolfia</i> -Zellen und fraktionierte Ammoniumsulfat- Fällung.....	50
2.2 Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q	51
2.3 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie an SOURCE 15PHE	52
2.4 Chromatographie an Hydroxyapatit	53
2.5 Anionenaustauschchromatographie an Mono Q.....	54
2.6 Größenausschlusschromatographie an Superdex 75	56
2.7 SDS-gelelektrophoretische Kontrolle der Enzymreinigung	57
2.8 Proteolytische Spaltung und Bestimmung von Peptidsequenzen	59
2.9 Homologievergleiche der Peptide	59
3 Klonierung und heterologe Expression des Vinorin-Synthase-Gens ..	61

3.1 Herstellen des ersten Vinorin-Synthase cDNA-Fragments	62
3.2 Amplifizieren der Vinorin-Synthase cDNA-Enden	65
3.3 Synthese des Vinorin-Synthase-Vollängenklons	66
3.4 Heterologe Expression und Aufreinigung der Vinorin-Synthase in <i>E. coli</i>	70
4 Enzymeigenschaften	75
4.1 Bestimmung von K_M -Werten	75
4.2 Bestimmung des pH-Optimums	81
4.3 Bestimmung des Temperatur-Optimums	83
4.4 Stabilität der Vinorin-Synthase.....	84
4.5 Einfluss von Inhibitoren.....	85
5 Primärstruktur der Vinorin-Synthase	87
6 Mutationen der Vinorin-Synthase	90
6.1 Primer-Design und PCR	91
6.2 Expression und Aufreinigung der mutierten Enzyme	93
6.3 Kinetik der mutierten Enzyme	94
7 Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse der Vinorin-Synthase....	103
7.1 Derivatisierung der Vinorin-Synthase mit Selenomethionin	112
V DISKUSSION	114
1 Die Bedeutung der Vinorin-Synthase.....	114
1.1 Bisherige und aktuelle Forschungsergebnisse	115
2 Eigenschaften der Vinorin-Synthase	118
2.1 Bisherige Forschungsergebnisse.....	118
2.2 Aktuelle Forschungsergebnisse	119
3 Sequenzanalyse der Vinorin-Synthase	121
4 Mutationen der Vinorin-Synthase	125
5 Kristallisation und Strukturaufklärung der Vinorin-Synthase.....	131
VI ZUSAMMENFASSUNG	133
VII LITERATURVERZEICHNIS	135

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

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

% (m/V)	Massenprozent (g in 100 ml Lösung)
% (V/V)	Volumenprozent (ml in 100 ml Lösung)
(NH ₄) ₂ SO ₄	Ammoniumsulfat
Å	Ångstrom
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-Benzenesulfonyl- fluorid
Amp	Ampicillin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
cDNA	Copy-DNA
CHT	Macro-PrepCeramic Hydroxyapatite
DC	Dünnschichtchromatographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotide (N = A,T,G,C)
DTT	Dithiothreitol
<i>E</i>	<i>Escherichia</i>
E-64	[N-(N-(L-3-trans-carboxirane-2-carbonyl)-L-leucyl)]- agmantine
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EI	Elektronenstoß-Ionisation
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
HCl	Salzsäure

HIC	Hydrophobe Interaktionen Chromatographie (Hydrophobic Interaction Chromatography)
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HPLC	Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (High Performance Liquid Chromatography)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
Kan	Kanamycin
kat	Katal, Enzymaktivität (Umsatz von 1 mol Substrat pro s)
k_{cat}	Wechselzahl (Anzahl der umgesetzten Substratmoleküle pro Enzymmolekül pro Sekunde)
kDa	Kilo-Dalton
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
KPi	Kaliumphosphat
Lux	Beleuchtungsstärke
M	Molare Konzentration
mAU	Milli-Absorptionseinheit
MeOH	Methanol
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
MLV	Maus-Leukämie-Virus
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure
m-RNA	Messenger-RNA
MSH	β -Mercaptoethanol
Na(BH) ₄	Natriumborhydrid
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natriumhydroxyd
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD	Optische Dichte

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
<i>Pfu</i>	Plaque forming units
PMSF	Phenylmethylsulfonyl-fluorid
PNA	Polyneuridinaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RP	Reversed Phase
Rt	Retentionszeit
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium Dodecylsulfate)
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA-Puffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T(%)	Konzentration an Acrylamid und Vernetzer in einem Polyacrylamidgel
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TLCK	L-1-chloro-3-(4-tosyl-amido)-7-amino-2-heptanon
TPCK	L-1-chloro-3-(4-tosyl-amido)-7-amino-2-butanon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolettes Licht
V_{\max}	Maximalgeschwindigkeit

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1:	<i>Rauvolfia serpentina</i>	5
Abbildung 2:	Therapeutisch genutzte Indol-Alkaloide aus <i>Rauvolfia</i>	6
Abbildung 3:	Biosyntheseweg des Ajmalins	10
Abbildung 4:	Reaktionsmechanismus der Vinorin-Synthase	11
Abbildung 5:	pQE2-Vektor.....	43
Abbildung 6:	His-tag-Abspaltung.....	43
Abbildung 7:	Mögliche Substrate der Vinorin-Synthase	47
Abbildung 8:	HPLC-Chromatogramme der Vinorin-Synthase.	48
Abbildung 9:	Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel.	50
Abbildung 10:	Chromatographie an SOURCE 30Q	51
Abbildung 11:	Chromatographie an SOURCE 15PHE	53
Abbildung 12:	Chromatographie an Hydroxyapatit	54
Abbildung 13:	Chromatographie an Mono Q	55
Abbildung 14:	Chromatographie an Superdex 75	56
Abbildung 15:	SDS-Gel Hydroxyapatit und Mono Q.....	58
Abbildung 16:	SDS-Gel nach Superdex 75	58
Abbildung 17:	Sequenz-Alignment bekannter Acetyltransferasen.....	62
Abbildung 18:	Polyacrylamid-Gel eines ersten cDNA-Fragments.	64
Abbildung 19:	Gele der 5´- und 3´-Race-PCR.....	66
Abbildung 20:	Gel des Vinorin-Synthase-Vollängenklons	67
Abbildung 21:	Nukleotid- und davon abgeleitete Aminosäuresequenz....	69
Abbildung 22:	Elutionsprofil der Vinorin-Synthase an Ni-NTA.....	71
Abbildung 23:	HPLC-analytische Untersuchung	72
Abbildung 24:	SDS-Gel nach der Reinigung an Ni-NTA.....	73
Abbildung 25:	Massenspektren	74
Abbildung 26:	Abhängigkeit der Vinorin-Synthase-(+His)-Aktivität.....	77
Abbildung 27:	Abhängigkeit der Vinorin-Synthase-(+His)-Aktivität.....	77
Abbildung 28:	Abhängigkeit der Vinorin-Synthase-(-His)-Aktivität.....	78
Abbildung 29:	Abhängigkeit der Vinorin-Synthase (-His) Aktivität... ..	79
Abbildung 30:	Abhängigkeit der Vinorin-Synthase-(-His)-Aktivität.....	80

Abbildung 31:	Abhängigkeit der Vinorin-Synthase(-His)-Aktivität.....	81
Abbildung 32:	pH-Optimum der Vinorin-Synthase.....	83
Abbildung 33:	Abhängigkeit der Aktivität von der Temperatur.....	84
Abbildung 34:	Sequenz-Alignment der Vinorin-Synthase.....	90
Abbildung 35:	SDS-Gel der mutierten Enzyme	93
Abbildung 36:	Abhängigkeit der S29A-Aktivität.....	95
Abbildung 37:	Abhängigkeit der S29A-Aktivität.....	96
Abbildung 38:	Abhängigkeit der C149A-Aktivität.....	97
Abbildung 39:	Abhängigkeit der C149A-Aktivität.....	98
Abbildung 40:	Abhängigkeit der C89A-Aktivität.....	98
Abbildung 41:	Abhängigkeit der S413A-Aktivität.....	99
Abbildung 42:	Abhängigkeit der Asn293A-Aktivität... ..	100
Abbildung 43:	Abhängigkeit der Asn293A-Aktivität... ..	100
Abbildung 44:	Erster Vinorin-Synthase-Kristall.....	105
Abbildung 45:	Reproduzierbare Vinorin-Synthase Kristalle	110
Abbildung 46:	Diffractionsbild eines Vinorin-Synthase-Kristalls	111

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1:	Auswahl bisher heterolog exprimierter Enzyme	2
Tabelle 2:	Säulenmaterialien	14
Tabelle 3:	Vektoren	15
Tabelle 4:	Enzyme und Zubehör für die Molekularbiologie	15
Tabelle 5:	Kits für die Molekularbiologie und Kristallisation	16
Tabelle 6:	Chemikalien und Zubehör	16
Tabelle 7:	Geräte	17
Tabelle 8:	Standard-Enzymaktivitäts-Assay	32
Tabelle 9:	HPLC-Gradient	34
Tabelle 10:	Verdau des Vollängenklons und des Vektors pQE2	40
Tabelle 11:	Reinigungsprotokoll der Vinorin-Synthase	57
Tabelle 12:	Ergebnis der Sequenzierung der Proteinbande	59
Tabelle 13:	Sequenzen der degenerierten Oligonukleotid-Primer	61
Tabelle 14:	Primer zur Synthese des ersten cDNA-Fragments	63
Tabelle 15:	Primer zur Synthese des 5`-und 3`- Endes	65
Tabelle 16:	Primer zur Synthese des Vinorin-Synthase-Vollängenklons ..	66
Tabelle 17:	Puffer für die Bestimmung des pH-Optimums	82
Tabelle 18:	Inhibitor-Studien mit der Vinorin-Synthase	86
Tabelle 19:	Enzymeigenschaften der Vinorin-Synthase	86
Tabelle 20:	Primersequenzen für die Mutationen der Vinorin-Synthase ...	92
Tabelle 21:	Kinetische Eigenschaften der Mutanten	100
Tabelle 22:	Spezifische Aktivitäten der zweiten Mutationsgruppe	102
Tabelle 23:	Relative Aktivität aller 13 Mutanten	102
Tabelle 24:	Screening I	106
Tabelle 25:	Screening II	107
Tabelle 26:	Reinigungsschema für die Vinorin-Synthase	116

I EINLEITUNG

1 Gewinnung und Charakterisierung von Proteinen

Die Wissenschaft widmet sich der Untersuchung der Struktur und Funktion von Proteinen bereits seit über 200 Jahren (Lottspeich und Zorbas 1998).

Homogenität und Reinheit der damals aufgereinigten Proteine entsprachen noch nicht den heutigen Ansprüchen, es zeigte sich jedoch, dass sich einzelne Proteine durchaus voneinander unterscheiden lassen. Bis Mitte des 20. Jahrhunderts blieben jedoch Struktur und Aufbau von Proteinen ungeklärt. Erst die Entwicklung leistungsfähiger Reinigungsmethoden, mit deren Hilfe sich Proteine aus komplexen Gemischen isolieren lassen, begleitet von der Revolution der Techniken zur Analyse der aufgetrennten Proteine, ermöglichte unser heutiges Verständnis der Proteinstrukturen (Lottspeich und Zorbas 1998).

Jahrzehnte lang bediente man sich der konservativen Methode der Proteinreinigung aus Pflanzen, Kalli und Zellsuspensionskulturen, um Proteine zu charakterisieren. Dies ist meist eine sehr erfolgreiche Methode, ein Protein zum ersten Mal aufzureinigen. Aufgrund der niedrigen Konzentration pflanzlicher Sekundärstoffwechsel-Enzyme werden jedoch mehrere Kilogramm Pflanzenmaterial benötigt, um nur wenige μg - mg reines Enzym zu erhalten. Die Entwicklung der Gentechnik hat den Biowissenschaften viele neue Möglichkeiten auf dem Gebiet der Proteinanalytik eröffnet. Die Gentechnik erlaubt nicht nur Einblicke in die Struktur der DNA, sondern macht es auch möglich, diese zu modifizieren. DNA lässt sich in vivo rekombinieren und in Organismen realisieren, in denen sie natürlicherweise nicht vorkommt.

So ist es möglich, beliebige Mengen eines Proteins in Wirtsorganismen wie z.B. Bakterien, Hefe oder Insektenzellen schnell herzustellen. Durch diese

effiziente Methode der heterologen Expressierung von Proteinen lassen sich diese nun viel einfacher charakterisieren (Lottspeich und Zorbas 1998).

Durch die rasante Entwicklung im Bereich der Gentechnik und der Molekularbiologie ist es in den letzten Jahren gelungen, eine Reihe von Enzymen, die an der Biosynthese pharmazeutisch wichtiger Naturstoffe, wie z.B. Alkaloide, beteiligt sind, heterolog zu exprimieren (siehe Tabelle 1). Dadurch ist die Forschung dem Ziel der biotechnologischen Produktion von biogenen Arzneistoffen einen bedeutenden Schritt näher gekommen.

Tabelle 1: Auswahl bisher heterolog exprimierter Enzyme des Alkaloidstoffwechsels

Enzyme	Strukturtyp - Alkaloid	Anwendung
Salutaridinol–Acetyltransferase (Grothe et al. 2001) Codeinon-Reduktase (Unterlinner et al. 1999)	Morphinan - Morphin Codein	Starkes Analgetikum, Antitussivum
Methylcocclaurin-O- Methyltransferase (Morishige et al. 2000) Methylcocclaurin-3-Hydroxylase (Pauli und Kutchan 1998) NADPH-Cytochrom-P450- Reduktasen (Rosco et al. 1997) Berberin-Brücken-Enzyme (Hauschild et al. 1998)	Benzylochinolin – Reticulin, Vorstufe von z.B. Morphin Berberin Tubocurarin	Starkes Analgetikum, Antimykotikum Muskelrelaxans
Acridon-Synthase (Springob et al. 2000)	Acridon Alkaloide – Acronycin	Onkologikum

Enzyme	Strukturtyp - Alkaloid	Anwendung
<p>Deacetylbaccatin-III-Acetyltransferase (Walker und Croteau 1999)</p> <p>C13-N-Benzoyltransferase (Walker et al. 2002b)</p> <p>Taxadienol-O-Acetyltransferase (Walker et al. 2000)</p> <p>C-13-Phenylpropanoid-Acyltransferase (Walker et al. 2002a)</p> <p>Taxan-Benzoyltransferase (Walker und Croteau 2000)</p>	<p>Pseudoalkaloid (Diterpenester) – Taxol</p>	<p>Zytostatikum</p>
<p>Deacetylvindolin–Acetyltransferase (St-Pierre et al. 1998)</p> <p>Desacetoxyvindolin-Hydroxylase (Vazquez-Flota et al. 1997)</p> <p>Enzyme der Ajmalin Biosynthese (Kutchan 1989), (Kutchan 1993), (Gerasimenko et al. 2002), (Dogru et al. 2000)</p>	<p>Monoterpenoide Indolalkaloide – Vindolin</p> <p>Ajmalin</p>	<p>Zytostatikum</p> <p>Antiarrhythmikum</p>

2 Strukturaufklärung durch Kristallisation

Die Methoden der Gentechnik liefern jedoch keine Informationen über die räumliche Struktur der Proteine. Die Kenntnis der dreidimensionalen Beschaffenheit, besonders die der katalytischen Zentren und Bindungsstellen, ist unverzichtbar für das Verstehen der Funktionen der Proteine. Mit röntgenkristallographischen Methoden kann die dreidimensionale Struktur von Proteinen bestimmt werden. Die Voraussetzung hierfür ist eine gleichmäßige Ausrichtung der Moleküle, die man (fast) nur durch Kristallisation erreicht (Ficner 1998). Noch vor der Entdeckung der Röntgenstrahlen wurden die ersten Protein-Kristalle beschrieben, so z.B. bereits 1894 der Kristall des Lichtsammelproteins Phycoerythrin (Ficner und Huber 1993), (Ficner et al. 1992). Durch die grundlegenden Arbeiten von Laue und Bragg an Salzkristallen im ersten Drittel des letzten Jahrhunderts ist es möglich geworden, durch Beugung von Röntgenstrahlen an einem Kristall ein Bild von der Anordnung der Atome im Kristall zu erhalten. Besteht der Kristall aus Molekülen, kann so die dreidimensionale Struktur dieser Moleküle bestimmt werden (Thomas 1993), (Ficner 1998). Seit den ersten erfolgreichen Kristallstrukturanalysen des Hämoglobins Ende der fünfziger Jahre (Krivacic und Rupley 1968), (Fermi et al. 1984) wurden bis heute die Röntgenstrukturen von über zwanzigtausend nicht-homologen biologischen Makromolekülen aufgeklärt (The Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org/pdb/>): unter anderem auch von Membranproteinen, Protein-Nukleinsäure-Komplexen und sogar von intakten Viren.

3 *Rauvolfia serpentina* – Biosynthese von Ajmalin

Rauvolfia serpentina (L.) Benth. ex Kurz ist eine alte Arzneipflanze, die in Indien seit über 3000 Jahren unter dem Namen „Sarpagandha root“ genutzt wurde (siehe Abbildung 1). Die Pflanze ist ein bis zu 1 m hoher Strauch, der in Savannen und Wäldern Südostasiens beheimatet ist. Therapeutische Anwendung fanden ihre Wurzeln gegen Schlangenbisse und Insektenstiche (Sahu 1979). In der Ayurvedischen Periode wurde die Wurzel Droge gegen eine Vielzahl von Krankheiten, wie z.B. Infektionskrankheiten, Magen-Darm-Erkrankungen und sogar Epilepsie und Geisteskrankheiten, eingesetzt.

Das Wissen über die Anwendungsmöglichkeiten der Droge verbreitete sich im Mittelalter über den arabischen Raum und gelangte schließlich nach Europa. Im Jahre 1703 fügte der französische Botaniker Charles Plumier der Pflanzenfamilie Apocynaceae die Gattung *Rauvolfia* zu (Plumier 1703).



Abbildung 1: *Rauvolfia serpentina*

Aufgenommen im Februar 2003 im Garten der Chulalongkorn-Universität in Bangkok/Thailand

Die heute therapeutisch verwendeten Inhaltsstoffe der Pflanze sind die monoterpenoiden Indolalkaloide Reserpin, Ajmalin und Ajmalicin (siehe Abbildung 2).

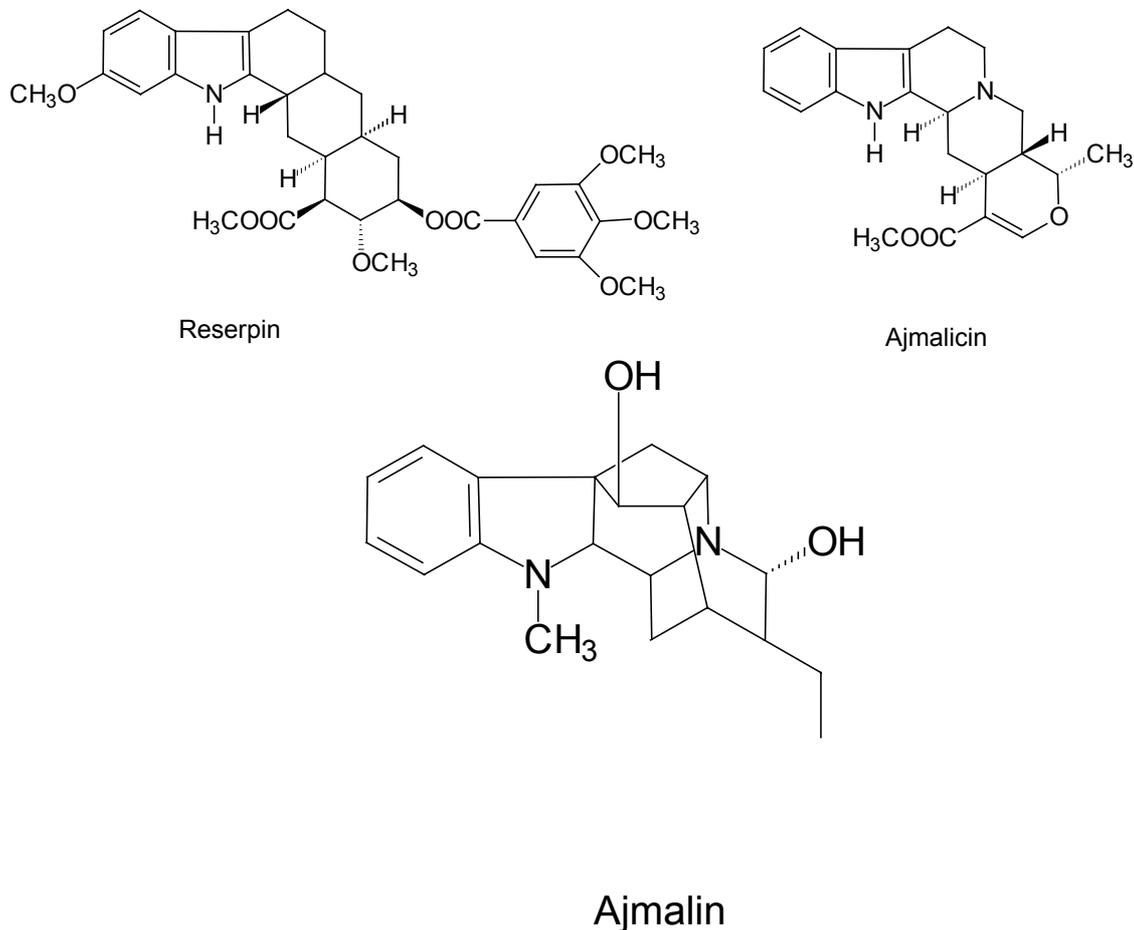


Abbildung 2: Therapeutisch genutzte Indol-Alkaloide aus *Rauvolfia*

Reserpin wirkt antisymphoton, antihypertonisch, sedativ und antipsychotisch (Müller et al. 1955), (Schütz 1996). Die antisymphotonische Wirkung beruht auf der Noradrenalinverarmung im postganglionären Sympathikus. Die antipsychotischen Wirkungen sind Folgen der Entspeicherung der Monoamine im ZNS (Lehmann und Ban 1997), (Schmeller und Wink 1998). Aufgrund seiner Nebenwirkungen ist Reserpin nur ein Antihypertensivum der zweiten Wahl (Schütz 1996). Ajmalicin (Raubasin) senkt den Blutdruck durch einen dem Reserpin analogen pharmakodynamischen Wirkmechanismus.

Ajmalin ist ein Antiarrhythmikum der Klasse IC. Antiarrhythmika der Klasse I verringern den Natrium-Einstrom während der Depolarisation durch Hemmung spannungsabhängiger Natrium-Kanäle. Aufgrund seiner schlechten Resorption ist Ajmalin nur zur parenteralen Verabreichung geeignet. Prajmaliumbitartrat, das weinsaure Salz des N-(Propyl)-Ajmalin, wird nach oraler Verabreichung nahezu vollständig aus dem Magen-Darm-Trakt resorbiert. Es kann deshalb oral bei Herzrhythmusstörungen eingesetzt werden (Neo-Gilurytma[®]).

Als Antiarrhythmikum ist Ajmalin seit 1959 auf dem Markt (Gilurytma[®]) (Kleinsorge 1959). Seine Strukturklärung erwies sich aufgrund des komplizierten Ringsystems als sehr schwierig und konnte erst 1961 durch die Aufdeckung der Stereochemie durch Bartlett (Bartlett et al. 1962) abgeschlossen werden. Zeitgleich mit der Aufklärung seiner Struktur wurden auch erste Hypothesen zur Biosynthese des Ajmalins aufgestellt (Robinson 1955), (Leete 1960), (Barton et al. 1965).

Rauvolfia serpentina ist nur schwierig kultivierbar. Da eine genaue Untersuchung des Biosyntheseweges jedoch nur mit ausreichend Zellmaterial möglich ist, war es ein großer Fortschritt als 1974 von Zenk gut wachsende Zellkulturen von *Rauvolfia* etabliert werden konnten (Stöckigt et al. 1981).

Durch Isolierung und Charakterisierung der beteiligten Enzyme konnte vor etwa 15 Jahren der Biosyntheseweg zwischen Strictosidin und Ajmalin festgelegt und in den folgenden Jahren wesentlich erweitert werden (Pfitzner und Stöckigt 1983a), (Pfitzner und Stöckigt 1983b), (Pfitzner et al. 1986), (Stöckigt et al. 1983), (Polz et al. 1987), (Falkenhagen und Stöckigt 1995).

Heute sind fast alle an der Biosynthese des Ajmalins beteiligten Enzyme bekannt (siehe Abbildung 3). Der Ajmalin-Biosyntheseweg ist einer der am besten untersuchten Biosynthesewege und kann somit als Modellsystem zur Untersuchung von Naturstoffbiosynthesen angesehen werden.

Der erste Schritt der Ajmalin-Biosynthese ist die Kondensation von Tryptamin und dem monoterpenoiden Glucosid Secologanin zum Strictosidin, katalysiert durch die Strictosidin-Synthase (SS) (Stöckigt und Zenk 1977a), (Stöckigt und Zenk 1977b), (Rueffer et al. 1978), (Nagakura et al. 1979), (Kutchan et al. 1988), (Pfitzner und Zenk 1989), (Kutchan 1993). Dies war das erste Enzym

des Biosyntheseweges von Ajmalin, das vor mehr als 10 Jahren heterolog exprimiert wurde (Kutchan 1989), (Kutchan et al. 1988). Nach der Deglucosilierung von Strictosidin durch die Strictosidin-Glucosidase (SG) (Gerasimenko et al. 2002) wird das instabile Aglykon über mehrere Schritte zum Geissoschizin umgewandelt. Die Bildung der C5 - C16 Bindung durch das Sarpagan-Brücken-Enzym (SBE) führt zum Polyneuridinaldehyd (Schmidt und Stöckigt 1995). Der nächste Schritt zum 16-epi-Vellosimin ist katalysiert durch die Polyneuridinaldehyd-Esterase (PNAE) (Dogru et al. 2000). Das Enzym Vinorin-Synthase (VS) katalysiert den Schritt vom 16-epi-Vellosimin zum Vinorin. Vomilenin wird gebildet durch die Vinorin-Hydroxylase (VH/CPR) und wird weiter umgewandelt zum 1,2-Dihydrovomilenin und 17-O-Acetylnorajmalin durch zwei NADPH-abhängige Reduktasen (VR/DHVR) (von Schumann et al. 2002), (Gao et al. 2002). Die Deacetylierung durch die Acetylerase (AE) und die Methylierung durch die N-Methyltransferase (NMT) führt schließlich zum Ajmalin. Das Hauptalkaloid der *Rauvolfia*-Zellkulturen, Raucaffricin, ist ein Nebenalkaloid des Biosyntheseweges der differenzierten Pflanze (Schübel et al. 1989), gebildet durch die Vomilenin-Glucosyltransferase (VGT). Vomilenin kann wieder zurückgebildet werden durch die Raucaffricin-Glucosidase (RG) (Schübel und Stöckigt 1986), (Warzecha et al. 1999).

Fünf der Enzyme des Biosyntheseweges zum Ajmalin sind bereits aktiv heterolog exprimiert. Zudem gelang es, die Gene der Strictosidin-Synthase und Strictosidin-Glucosidase zusammen in einem Vektor aktiv zu exprimieren (Hammes und Stöckigt).

So scheint es nur noch eine Frage der Zeit zu sein, bis es gelingen wird, den gesamten Biosyntheseweg in einem fremden, effizienteren Organismus als die differenzierte Pflanze zu exprimieren.

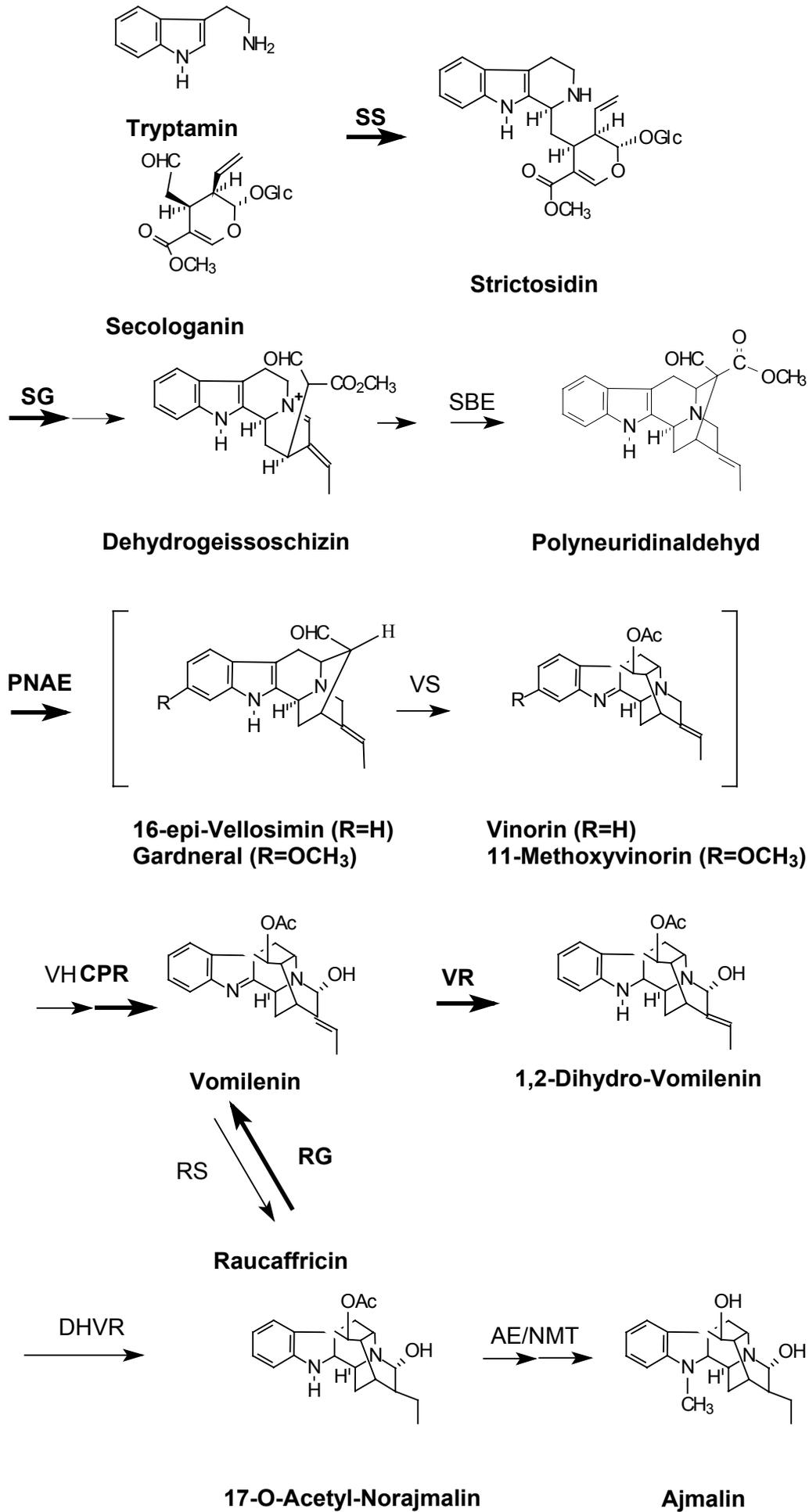


Abbildung 3: Biosyntheseweg des Ajmalins in *Rauvolfia* Zellsuspensionskulturen

SS: Strictosidin-Synthase; SG: Strictosidin-Glucosidase; SBE: Sarpagan-Brücken-Enzym; VS: Vinorin-Synthase; VH: Vinorin-Hydroxylase; CPR: CyP450-Reduktase; VR/DHVR: Vomilenin-Reduktasen; AE: Acetylerase; NMT: N-Methyltransferase; RG: Raucaffricine-Glucosidase. Dickgedruckte Pfeile symbolisieren heterolog exprimierte Enzyme. Die Reaktion von 16-epi-Vellosimin zum Vinorin, die durch Klammern gekennzeichnet ist, wird in der vorliegenden Arbeit ausführlich diskutiert.

4 Die Rolle der Vinorin-Synthase als Acetyltransferase

Die Vinorin-Synthase wurde vor fast 20 Jahren aus *Rauvolfia*-Zellsuspensionskulturen aufgereinigt und charakterisiert (Pfitzner und Stöckigt 1983a), (Pfitzner und Stöckigt 1983b), (Pfitzner 1984). Die Arbeiten wurden von Obitz (Obitz 1995), Körnig (Körnig 1997) und Goldhammer (Goldhammer 2001) fortgeführt.

Die Vinorin-Synthase ist ein an der Biosynthese des Ajmalins beteiligtes Enzym, das in einer anspruchsvollen Acetyl-Coenzym-A abhängigen Reaktion die Bildung von Vinorin aus 16-epi-Vellosimin katalysiert. Dieser Acetyl-Transfer wird benötigt, um das Alkaloid 16-epi-Vellosimin vom Sarpagan-Typ umzuwandeln in Vinorin, ein Alkaloid vom Ajmalan-Typ (siehe Abbildung 4).

Bei dieser Reaktion wird eine neue C-C-Bindung zwischen C7 und C17 geschlossen und die OH-Gruppe C17 acetyliert. Die Vinorin-Synthase ist ein wichtiges Enzym in der Ajmalin-Biosynthese, da es benötigt wird, um biosynthetisch das Sarpagan-Gerüst mit dem Ajmalan-Gerüst zu verknüpfen. Acetyl-CoA-abhängige Acetyltransferasen spielen eine bedeutende Rolle im Metabolismus von menschlichen, tierischen, bakteriellen und pflanzlichen Zellen. Eine Acetylierung wird zum Beispiel benötigt beim Fettsäuretransport (Jogl und Tong 2003) und der Synthese des Neurohormons Melatonin in Menschen und Tieren (Hickman et al. 1999). Außerdem führt die Reaktion zur Resistenz einiger Bakterien gegen Antibiotika wie Chloramphenicol und Streptogamin (White et al. 1999), (Jensen et al. 2000), (Sugantino und Roderick 2002).

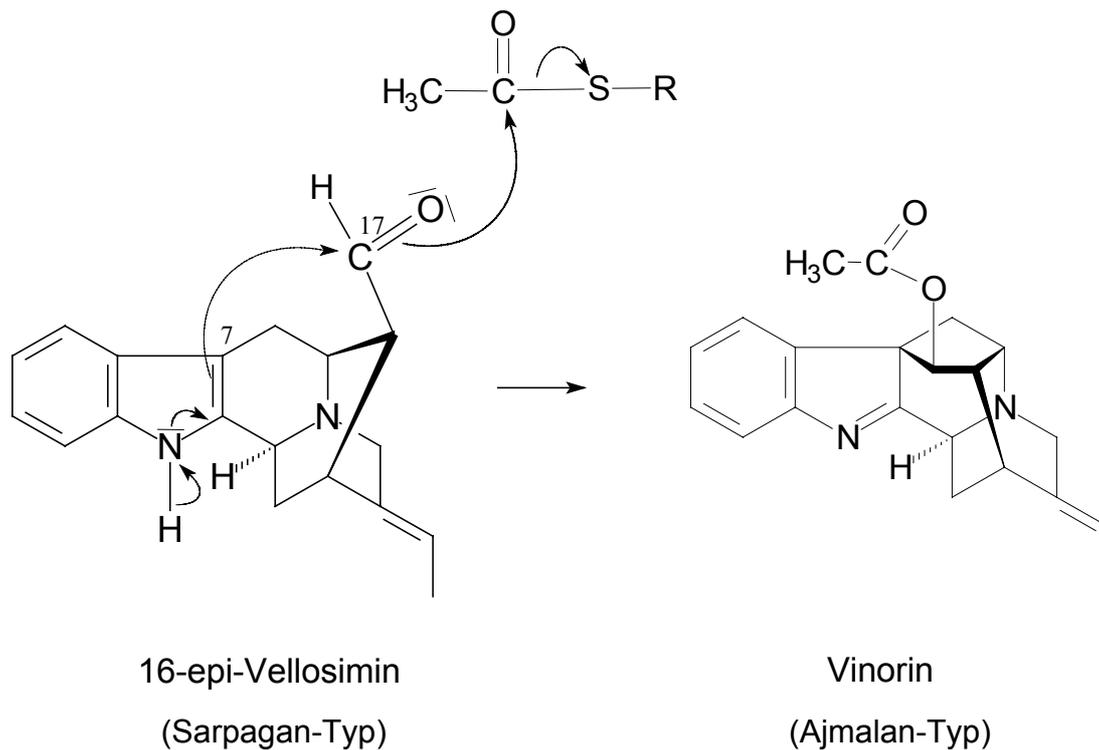


Abbildung 4: Reaktionsmechanismus der durch die Vinorin-Synthese katalysierten Reaktion

In fast jedem bedeutenden Biosyntheseweg kommen Acetyltransferasen vor. Ein Acetyltransfer wurde in *Catharanthus roseus* bei der Biosynthese des Vindolins (St-Pierre et al. 1998), (Fahn und Stöckigt 1990), der direkten Vorstufe, der als Cytostatika eingesetzten, dimeren Alkaloide Vinblastin und Vincristin, beschrieben. Eine weitere Acetyltransferase, die Salutaridinol-Acetyltransferase, katalysiert einen wesentlichen Schritt in der Biosynthese des Morphins in *Papaver somniferum* (Grothe et al. 2001). Auch an der Taxolbiosynthese in verschiedenen *Taxus*-Arten sind mehrere Acetyltransferasen beteiligt (Walker und Croteau 1999), (Walker und Croteau 2000), (Walker et al. 2000), (Walker et al. 2002a), (Walker et al. 2002b). Die Vinorin-Synthase nimmt also eine bedeutende Rolle in der Ajmalin-Biosynthese ein.

5 Ziel der Arbeit

Mindestens 10 hoch substratspezifische Enzyme sind an der Biosynthese von Ajmalin beteiligt. Bisher ist es gelungen, fünf von ihnen bis zur Homogenität zu reinigen und heterolog zu exprimieren. Sind alle Gene der Ajmalin-Biosynthese entschlüsselt, kann man den gesamten Biosyntheseweg in einen effizienteren Organismus transferieren und ihn so regulieren, dass z.B. pharmazeutisch genutzte Stoffe vermehrt gebildet werden.

Ziel der Arbeit ist es deshalb, ein geeignetes Reinigungsschema zu entwickeln, das eine ausreichende Menge der Vinorin-Synthase zur Verfügung stellt, um die Aminosäuresequenz aufzuklären.

Basierend auf der Aminosäuresequenz soll durch molekularbiologische Methoden die DNA-Sequenz aufgeklärt werden. Anschließend soll versucht werden, das Enzym heterolog in *E. coli* zu exprimieren. Dadurch ist es erstmals möglich, schnell relativ große Enzymmengen in reiner Form zu erhalten, die es erlauben, die Vinorin-Synthase ausführlich biochemisch zu charakterisieren. Dazu gehören die Bestimmung des pH- und Temperatur-Optimums, sowie diverse kinetische Parameter (K_M -Wert und V_{max}) der Substrate.

Weiterhin wäre es dann wichtig, durch Punktmutation essentielle Aminosäuren des Enzyms zu identifizieren.

Schließlich könnte die Vinorin-Synthase sogar kristallisiert werden, um die dreidimensionale Struktur aufzuklären und den Reaktionsmechanismus des Enzyms zu verstehen. Ist es möglich den Mechanismus aufzuklären, so wäre er womöglich auf alle Acetyltransferasen der Enzymfamilie übertragbar, so dass zum ersten Mal allgemein-gültige Aussagen zur gesamten Enzymfamilie zu machen wären.

II MATERIAL

1 Biologisches Material

1.1 Pflanzliche Zellkulturen

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Proteinreinigungen wurden Hybrid-Zellsuspensionskulturen von *Rauvolfia serpentina* und *Rhazya stricta* (RRM) (Sheludko et al. 2000), (Kostenyuk et al. 1991) verwendet. Die eingesetzten Zellkulturen entstammen der Sammlung des Lehrstuhls für Pharmazeutische Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz und werden deshalb mit RRM (M=Mainz) abgekürzt.

Die Kultivierung der Zellkulturen erfolgte in 1-Liter-Erlenmeyerkolben, die mit Schaumgummistopfen steril verschlossen wurden, bei einer Umgebungstemperatur von 25 ± 2 °C und diffusem Dauerlicht (ca. 600 Lux). Durchmischt wurden die Zellen durch kontinuierliches Schütteln (100 rpm) der Erlenmeyerkolben auf Rotationsschüttlern. Zur Subkultivierung wurden wöchentlich ca. 200 ml Zellsuspension unter keimfreien Bedingungen in 250 ml frisches LS-Medium überimpft.

Das LS-Medium wurde gemäß Linsmaier und Skoog (Linsmaier und Skoog 1965) unter Zusatz von 1×10^{-6} mol/l 1-Naphthylelessigsäure und 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure hergestellt und mit 1 M NaOH auf pH 5.7 eingestellt.

1.2 Bakterienstämme

Die *Escherichia coli*-Stämme TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe) und M15 [pREP4] (Qiagen, Hilden) wurden in LB-Medium, bei Bedarf unter Zusatz von Antibiotika, bei 37 °C im Schüttler (200 rpm) inkubiert.

LB Medium (Sterilisation durch Autoklavieren): 1.0 % Trypton , 0.5 % Hefe-Extrakt, 1.0 % NaCl, pH 7.0.

Für LB-Kulturplatten wurden dem LB-Medium 20 g/l Agar zugesetzt.

2 Puffer

KPi-Puffer wurden hergestellt durch das Mischen von 1 M KH_2PO_4 und 1 M K_2HPO_4 . Der pH-Wert konnte durch das jeweilige Mischungsverhältnis der beiden Lösungen eingestellt werden. Die Puffer wurden verdünnt angewendet.

Tris/HCl-Puffer wurden aus 1 M Tris-Stammlösung hergestellt, die je nach Bedarf verdünnt und der pH mit HCl eingestellt wurde.

Die genaue Zusammensetzung der jeweiligen Puffer wird im Methodenteil detailliert angegeben.

3 Säulenmaterialien, Leersäulen und Fertigsäulen

Tabelle 2: Säulenmaterialien

Hersteller/Lieferant	Produkte
Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)	Fertigsäulen: Source 30Q (XK50/20), Source 15Phe (XK16/20), CHT (C15/30), MonoQ (HR5/5), Superdex75 (HR10/30) Leersäulen : HR10/2, XK16/20
Macherey & Nagel (Düren)	Lichrospher 60 RP select B column
Qiagen (Hilden)	Ni-NTA Superflow
Sigma (München)	G25

4 Verwendete Vektoren

Tabelle 3: Vektoren

Vektor	Beschreibung
pGEM-T easy (Promega, Madison, USA)	Größe: 3.0 kbp, eignet sich zur Ligation von PCR-Produkten. Der linearisierte Vektor trägt an beiden 3`-Enden Thymidin-Überhänge. Erhöhte Effizienz der Ligation bei DNA-Fragmenten mit A-Überhang durch <i>Taq</i> -Polymerasen. (Ampicillin-Resistenz)
PQE2 (Qiagen, Hilden)	Größe: 4.8 kbp, codiert für einen 6-fachen N-terminalen his-tag, der den Enzymen bei der Expression angefügt wird; leichte Aufreinigung über Ni-NTA. (Ampicillin-Resistenz)

5 Enzyme und Zubehör für die Molekularbiologie

Tabelle 4: Enzyme und Zubehör für die Molekularbiologie

Hersteller	Produkte
Clontech (Palo Alto, USA)	Advantage-Polymerase Mix
Eurogentec (Seraing, Belgien)	Smart Ladder
Gibco (New England Biolabs)	Restriktionsendonukleasen, M-MLV Reverse Transkriptase, <i>Taq</i> DNA-Polymerase
MWG Biotech (Ebersberg)	Primer
Promega (Madison, USA)	T4-DNA Ligase, dNTP`s, Oligo (dT)-Primer
Stratagene (La Jolla, USA)	<i>Pfu Turbo</i> -Polymerase

6 Kits für die Molekularbiologie und Kristallisation

Tabelle 5: Kits für die Molekularbiologie und Kristallisation

Hersteller	Kits
Hampton Research (Laguna Niguel, USA)	Crystal Screen I/II
Invitrogen (Karlsruhe)	GeneRacer
Macherey & Nagel (Düren)	NucleoSpin Extract/Plasmid
PEQLAB (Erlangen)	Peq GOLD RNA pure™
Qiagen (Hilden)	TAGzyme Kit „for Exoproteolytic cleavage of N-terminal His tags“
Stratagene (La Jolla, USA)	QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit

7 Spezielle Chemikalien und Zubehör

Alle Chemikalien und Zubehör, die im Folgenden nicht genannt werden, stammen aus gängigen Bezugsquellen.

Tabelle 6: Chemikalien und Zubehör

Hersteller/Lieferant	Produkte
Acros	Selenomethionin
Amicon (Witten)	Microcon-10,30 und Centriprep YM-10 Einwegkonzentratoren,
AppliChem (Darmstadt)	Acrylamid-Lösung, DEPC, IPTG, Antibiotika, Lysozym, Acetyl-Co A, TEMED, Tris, Glycin

Calbiochem (La Jolla, USA)	TPCK, TLCK
Fluka (Seelze)	Lysin, Phenylalanin, Selenomethionin und Threonin Isoleucin, Leucin und Valin
Fresenius (Bad Homburg)	Ampuwa
ICN (Eschwege)	SDS, Agarose
Life-Technologies (Eggenstein)	Pepton, Agar
Intermedica (Klein-Winternheim)	Einmal-Pipettenspitzen, Küvetten
Merck (Darmstadt)	MeOH für HPLC, DC-Platten, HgCl ₂ , PEG 400
Roche (Mannheim)	AEBSF, E-64
Roth (Karlsruhe)	Acetonitril , RNase away spray
Serva (Heidelberg)	Dialyseschläuche (Durchmesser 16 cm und 29 cm), Coomassie Brilliant Blue G 250
Sigma (München)	Feinchemikalien

8 Geräte

Tabelle 7: Geräte

Anwendung	Geräte/Hersteller
Aufschluss von Bakterien	Sonoplus Homogenisator HD 2070 (Bandelin/Berlin)
Dokumentation	Entwicklermaschine RG II/Fuji
Elektrophorese von Proteinen und Nukleinsäuren	Vertikal: SE 600 Hoefer (Amersham Pharmacia, Freiburg) Horizontal: BlueMarine 100 und 200 (Serva, Heidelberg)

Elektrophorese von Proteinen und Nukleinsäuren	Netzgeräte: PowerPac 3000 (BioRad, München), PS 500XT DC Power Supply (Hofer Scientific Instruments, San Francisco, USA)
HPLC-Analytik	Merck-Hitachi-System (Merck, Darmstadt): Pumpe L-6200, Autosampler AS-2000, UV/VIS-Detektor L-4250, Chromato-Integrator D-2500
EI-MS-Analytik	MAT 44 S (Finnigan, Bremen)
Mikroskop	Laborlux S (Leica, Solms)
PCR	Progene Thermocycler (Thermo-DUX, Wertheim), Genius Thermocycler (Techne), Mastercycler personal (Eppendorf, Hamburg)
Proteinreinigung	ÄKTA-Explorer-System (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) 2 Pumpen P-900, 2 Durchfließzellen (22 µl und 88 µl) zur Messung von pH, Temperatur, Leitfähigkeit), Multi-wavelength UV-VIS-Detektor UV-900, Mischkammer M-900, Pufferventil, IV-908, Säulenselektionsventil PV-98, Fraktionskollektor, Frac-900, Kühlung: Maxicold-Kühlschrank (Amersham Pharmacia, Freiburg), Computer: Pentium-133 MHz PC Compaq, Software: UNICORN Control System
Seralwasser	Seralpur PRO 90 CN (Seral, Ransbach-Baumbach)
Schüttler	Pilot Shake RC 2 SR (Braun, Melsungen), Schüttelinkubatoren 1083 und 3032 (GFL, Burgwedel)
Sterilisation und steriles Arbeiten	Laminar-Flow-Box (Fröbel), NU 440-400 E (Zapf, Sarstedt)
Temperieren	Thermomixer 5437, Thermomixer comfort, Thermostat 5320 (Eppendorf, Hamburg), Wasserbäder: Fisherbrand FBC 620 (Fisher Scientific, Loughborough, UK), F20 HC (Julabo, Seelbach)
UV-Spektroskopie	Lambda 2-Spektrometer (Perkin Elmer, Überlingen), Ultrospec II (LKB, Freiburg)
Zentrifugation	Kühlzentrifuge Avanti J-25 mit Rotor JA 10 und JA 20 (Beckman, München),

	Kühlzentrifuge Sorvall RC 28 S, RC 5 B mit Rotoren GS-3 und SS-34 (DuPont, Bad Homburg), Kühlzentrifuge Z 320 K mit Rotor für 2 ml Reaktionsgefäße (Hermle, Gosheim), Kühlzentrifuge Universal 16/16 R (Hettich Tuttlingen), Tischzentrifuge Biofuge 15 mit Rotor für 2 ml Reaktionsgefäße (Hereaus, Osterode)
Zerkleinern von Gewebe	Ultraturrax TP 18/10 (IKA, Stauffen)
Röntgenstrukturanalyse	Rigaku RU-200 Einkreisdiffraktometer mit CuK α -Strahlung und einem 300 mm „image plate“ Detektor (MAR Research, Germany), Kryo Kühlsystem (Oxford Cryosystems), EMBL-beamline BW7B (Hamburg)

III METHODEN

1 Proteinreinigung

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

1.1 Präparation von Enzymrohextrakten aus Pflanzenzellen

Die mit flüssigem Stickstoff eingefrorenen Pflanzenzellen (2 kg) wurden mit der gleichen Menge (m/V) Puffer A (100 mM KPi, pH 7.8, 5 mM Na₂EDTA, 10 mM MSH, 0.5 % Natriumascorbat, 2.5 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon, 10 % (v/v) Glycerol) versetzt und schonend aufgetaut. Die Mischungen wurden ca. 2 min mit dem Ultraturrax homogenisiert, durch Baumwollgazen gefiltert und anschließend bei 10000 × g 10 min zentrifugiert.

Der erhaltene Überstand wurde mit (NH₄)₂SO₄ in den Konzentrationsbereichen 0 - 40 % (m/V) und 40 - 60 % (m/V) fraktioniert gefällt.

Das zweite Präzipitat wurde in 0.2 l Puffer B (20 mM Tris/HCl, pH 8.0, 2 mM Na₂EDTA, 10 mM MSH, 10 % (v/v) Glycerol) gelöst und bei 10000 x g 10 min zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde auf einer mit 500 ml G25 gefüllten Säule mit Puffer B entsalzt, um ihn so von gelösten niedermolekularen Begleitstoffen zu befreien.

Anschließend wurde die Enzymlösung weiter säulenchromatographisch aufgereinigt.

1.2 Präparation von Enzymrohextrakten aus Bakterienzellen

Um einen Enzymrohextrakt zu erhalten, wurden 10 ml *E-coli* Übernachtskultur (M15 Stamm, der das pQE2-Vinorin-Synthase-Konstrukt enthielt) in 2l flüssiges LB-Medium gegeben, das zuvor mit 100µg/ml Ampicillin und 25µg/ml Kanamycin versetzt wurde. Es wurde 0.5 mM IPTG zugesetzt und die Zellen bei RT 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden sie bei 5000 x g 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde entweder direkt oder nach Lagerung bei -20 °C weiterverwendet.

Die Resuspendierung erfolgte mit 2ml Lysepuffer (50 mM KPi pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM MSH) pro Gramm Bakterienpellet. Nach Zusatz von Lysozym (1 mg pro ml Lysepuffer) wurde die Lösung 30 min bei 4 °C inkubiert und mit Ultraschall aufgeschlossen.

1.3 Aufschluss der Zellen mittels Ultraschall

Der nach 1.2 erhaltene Bakterienrohextrakt wurde unter Kühlung mit Eis mit dem Ultraschall Gerät Sonoplus HD 2070 bei 75W für 6 x 10 s aufgeschlossen. Anschließend wurde für 30 min bei 14000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der klare Überstand konnte direkt für die anschließende Enzymreinigung verwendet werden.

1.4 Ammoniumsulfatfällung

Für die Ammoniumsulfatfällung wurde $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Pulver konstant über einen Zeitraum von einer Stunde portionsweise zur Proteinlösung hinzugegeben (4 °C, unter Rühren) bis eine Salzkonzentration von 40 % erreicht war. Nach der Zentrifugation (30 min, 10000 x g, 4 °C) wurde dem Überstand erneut $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bis zu einer Endkonzentration von 60 % hinzugefügt. Die Lösung wurde erneut zentrifugiert und das Proteinpellet in 100 ml Puffer B (siehe 1.1) gelöst. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde der Überstand mit Hilfe

einer Säule, gefüllt mit 500 ml G25-Säulenmaterial unter Verwendung von Puffer B, entsalzt.

1.5 Dialyse

Die Dialyse dient dem Entsalzen und Umpuffern von Proteinlösungen.

Die zur Dialyse verwendeten Schläuche haben Durchmesser von 16 oder 29 mm. Verwendet wurden Dialysemembran-Schläuche mit einer Molekulargewichtsausschlußgröße von 12 - 14 kDa. Die Wahl des Dialyseschlauchs und das Volumen des Puffers richtet sich nach dem Probenvolumen. Eventuell musste die Dialyselösung mehrmals gegen frischen Puffer ausgetauscht werden. Die Dialyse erfolgte bei 4°C und leichtem Rühren über Nacht.

1.6 Konzentrieren von Proteinlösungen

Die zu konzentrierenden Proteinlösungen konnten durch den Einsatz von Membranen mit definierten Ausschlußgrößen in kürzester Zeit eingeeengt werden.

Volumina > 2ml wurden mit Hilfe von Centripep YM10 (Ausschlußgröße 10 KDAa) Einwegkonzentratoren, durch Zentrifugation bei 3000 x g auf ein Endvolumen von 100 - 500 µl eingeeengt.

Bei Volumina < 2ml wurden Microcon YM10 oder 30 Einwegkonzentratoren bei 10000 x g verwendet.

1.7 Elektrophoretische Methoden

1.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Bei dieser von Shapiro (Shapiro et al. 1967) eingeführten Technik der denaturierenden Gelelektrophorese werden Proteine anhand ihrer unterschiedlichen Molekülgrößen getrennt.

SDS (Weber und Osborn 1969) ist ein anionisches Detergenz und überdeckt die Eigenladung von Proteinen so effektiv, dass Micellen mit konstanter negativer Ladung pro Masseneinheit entstehen.

Bei der Probenvorbereitung werden die Proben mit einem Überschuss von SDS auf 95 °C erhitzt, so dass die Quartär- und Tertiärstrukturen durch Aufspalten der Wasserstoffbrücken und durch Streckung der Moleküle aufgelöst werden. Bestehende Cystin-Disulfidbindungen werden durch die Zugabe des reduzierenden Thiols Mercaptoethanol (MSH) durch eine Disulfidaustauschreaktion gespalten. Da die Wanderungsgeschwindigkeit der negativ geladenen SDS-Proteinmicellen fast ausschließlich durch ihre Größe bestimmt ist, eignet sich dieses Verfahren auch zur Bestimmung von Molekülmassen.

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

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

Elektrophoreseparameter:

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

Gelherstellung:

Das Gel besteht aus zwei Bereichen. In einem großporigen Sammelgel werden die Proteine zunächst zu einer scharfen Bande konzentriert, die dann in dem engmaschigen Trenngel aufgetrennt wird.

Zwischen zwei Glasplatten (16 x 18 cm, Abstand 1.5 mm) wurde zunächst die frische Trenngellösung gegossen. Um während des Auspolymerisierens (ca. 1 h) eine glatte Oberfläche zu erreichen, wurde die Trenngellösung mit Wasser überschichtet.

Anschliessend wurde das Wasser abgegossen, die Sammelgellösung aufgegeben und der Probenkamm eingesetzt. Nach weiteren 45 min konnte das Gel verwendet werden.

Für die Gelherstellung verwendete Lösungen:

Acrylamid-Stammlösung

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

29.2 % (m/V) Acrylamid

0.8 % (m/V) Bis-Acrylamid

Trenngel-Lösung ($T = 11 \%$)

11.0 ml Acrylamid-Stammlösung

7.5 ml 1.5 M Tris/HCl, pH 8.8

11.2 ml Wasser

membranfiltriert (0.45 μm), entgast

Zugabe unmittelbar vor Gebrauch:

150 μl 20 % (m/V) SDS-Lösung

20 μl TEMED

150 μl 10 % (m/V) APS-Lösung

Sammelgel-Lösung ($T = 5 \%$)

2.5 ml Acrylamid-Stammlösung

3.7 ml 0.5 M Tris/HCl, pH 6.8

8.5 ml Wasser

membranfiltriert (0.45 μm), entgast

Zugabe unmittelbar vor Gebrauch:

75 μl 20 % (m/V) SDS-Lösung

10 μl TEMED

200 μl 10 % (m/V) APS-Lösung

Probenvorbereitung:

Die Proteinlösung wurde mit Probenpuffer im Verhältnis 2 : 1 (V/V) bis zu einem maximalen Auftragsvolumen von 150 µl für 5 min bei 95 °C erhitzt.

Nun wurden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert und langsam mit Laufpuffer überschichtet. Anschließend wurden die Glasplatten in den Elektrophoretank eingebracht und die Elektrophorese gestartet.

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

Probenpuffer

0.2 M Tris/HCl, pH 6.8

20 % (V/V) MSH

40 % (V/V) Glycerol

8 % (m/V) SDS

0.02 % (m/V) Bromphenolblau

1.7.2 Färbemethoden der SDS Gele

Um die Proteinbanden auf den SDS Gelen sichtbar zu machen, wurden die Gele je nach Proteingehalt mit einer der zwei folgenden Färbemethoden angefärbt.

1.7.2.1 Coomassie Färbung

Die am häufigsten eingesetzte und einfachere Färbemethode ist die Färbung mit Coomassie Blue (Blakesly und Boezi 1977). Hierbei können jedoch nur

Proteinmengen von minimal 0.1 - 0.3 µg pro Bande in Elektrophoresegelen detektiert werden.

Die Gele werden 30 - 60 min in Färbelösung gelegt. Da der Farbstoff an Proteine besser bindet als an die Gelstrukturen, konnte anschließend unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung das Gel solange entfärbt werden, bis nur noch Proteine als blaue Banden sichtbar waren.

Färbelösung

0.25 % (m/V) Coomassie Blue R-250
45 % (V/V) Methanol
9 % (V/V) Essigsäure

Entfärbelösung

30 % (V/V) Methanol
9 % (V/V) Essigsäure

1.7.2.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung (Heukeshoven und Dernick 1988), (Sammons et al. 1981) ist wesentlich empfindlicher als die Coomassiefärbung. Mit ihr lassen sich noch Proteinmengen von 1 - 30 ng pro Bande sichtbar machen.

Die Gele wurden erst zweimal je 30 min in der Fixierlösung und anschließend eine Stunde in der Inkubationslösung geschwenkt. Nach drei je zehnmütigen Waschschrinen mit Wasser erfolgte für 20 min die Inkubation in der Silberlösung unter Lichtausschluss. Nach kurzem Abspülen des Gels mit Wasser wurde es solange in die Entwicklerlösung gelegt, bis deutliche Proteinbanden sichtbar wurden. Die Entwicklung wurde mit 10 % Essigsäure abgestoppt.

Fixierlösung

30 % (V/V) Ethanol
10 % (V/V) Essigsäure

Silberlösung

0.2 % (m/V) Silbernitrat
0.01 % (m/V) Formaldehyd

Entwicklerlösung

2.5 % (m/V) Natriumcarbonat
0.02 % (m/V) Formaldehyd

Inkubationslösung

30 % (V/V) Ethanol
6.8 % (m/V) Natriumacetat
0.125 % (m/V) Glutardialdehyd
0.2 % (m/V) Natriumthiosulfat × 5 H₂O

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

1.8 Gehaltsbestimmung von Proteinlösungen

Die Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Bradford (Bradford 1976) mit BSA als Standard bestimmt.

Hierzu wurden 100 µl Proteinlösung mit 900 µl Coomassie Reagenz vermischt (50 mg Coomassie Brilliant Blue G 250 werden in 50 ml 96 % Ethanol gelöst und nach Zugabe von 100 ml 85 % (V/V) Phosphorsäure mit Wasser auf 100 ml abgefüllt) und die Absorption bei 595 nm mit einem Perkin-Elmer-Spectrophotometer gemessen.

Die benötigte Kalibrierungskurve wurde mit BSA-Konzentrationen von 10 – 100 µg/ml erstellt.

1.9 Chromatographische Methoden

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

1.9.1 Anionenaustauschchromatographie

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

1.9.1.1 Anionenaustauschchromatographie an Source 30Q

Das Material Source 30Q ist ein sehr starker Anionenaustauscher. Seine Gelmatrix besteht aus porösen, monodispersen Polystyrol-Divinylbenzol-Kugeln (Durchmesser 30 µm).

Funktionelle Gruppe ist ein quartäres Ammoniumkation, das kovalent an die Polymerpartikel gebunden ist. Die einheitliche Größe der Partikel und die Abwesenheit von Partikelfragmenten in Verbindung mit der porösen Eigenschaft des SOURCE 30Q-Materials ermöglichen hohe Flußraten bei geringerem Druck im Vergleich zu anderen Materialien gleicher Partikelgröße.

Der in 1.1 erhaltene Proteinrohextrakt wurde auf eine Source 30Q-Säule aufgegeben (XK50/20, Pharmacia, Säulenvolumen 240 ml, äquibriert mit zwei Säulenvolumen Puffer B (siehe Kapitel 1.1)). Die gebundenen Proteine wurden mit einem linear ansteigenden KCl-Gradienten (hergestellt aus Puffer B und C (Zusammensetzung wie Puffer B und 1M KCl)) von 0 - 0.5M eluiert und fraktioniert (Flussrate 20 ml/min, Fraktionsgröße 12 ml/Fraktion).

1.9.1.2 Anionenaustauschchromatographie an MonoQ

Die bereits vom Hersteller gepackte MonoQ HR 5/5 dient der Feinreinigung geringer Enzymmengen. Der stark basische Anionenaustauscher besitzt als funktionelle Gruppe positiv geladene Tetraalkylammoniumgruppen, die an hydrophilen, kugelförmigen Harzpartikeln mit einer Größe von ca. 10 µm haften.

Vor jeder Reinigung wurde die Säule mit Puffer B äquilibriert.

Gebundene Proteine wurden mit einem ansteigenden KCl Gradienten bestehend aus Puffer B und C eluiert (0.15 - 0.45 M innerhalb 24 min, 0.45 - 0.5 M innerhalb von 5 min, Flussrate 1 ml/min, Fraktionsgröße 1 ml/Fraktion).

1.9.2 Hydrophobe Interaktionen Chromatographie an Source 15PHE (HIC)

Die Hydrophobe Interaktionen Chromatographie ist dadurch gekennzeichnet, dass die unpolaren Oberflächenregionen eines Proteins bei hohen Salzkonzentrationen an die schwachen hydrophoben Liganden einer stationären Phase adsorbieren. Die Elution der Probenmoleküle wird durch die Verringerung der Salzkonzentration erzielt.

Bei der HIC wurde das Säulenmaterial Source 15PHE genutzt. Das Material besteht aus der gleichen Matrix wie Source 30Q, jedoch sind hier an der Oberfläche hydrophobe Phenylreste (Partikeldurchmesser 15 µm) gebunden. Die Proteinlösung wurde bis 40 % mit Ammoniumsulfat gesättigt und auf die Säule (XK16/20, Pharmacia, Säulenvolumen 30ml) aufgebracht, die zuvor mit Puffer D (wie Puffer B (siehe 1.1) und 1 M Ammoniumsulfat) äquilibriert wurde.

Die Säule wurde mit Puffer D gewaschen und gebundene Enzyme mit einem linearen Ammoniumsulfat Gradienten, bestehend aus Puffer D und B (1 - 0 M, Flussrate 5 ml/min, Fraktionsgröße 5 ml/Fraktion), fraktioniert.

1.9.3 Chromatographie an Macro-PrepCeramic Hydroxyapatit (CHT)

Hydroxyapatit ist eine kristalline Form von Calciumphosphat. Proteine adsorbieren an der Kristalloberfläche. Das Trennprinzip beruht darauf, dass sowohl Amino- als auch Carboxygruppen mit der Oberfläche der nicht porösen Hydroxyapatitkristalle interagieren.

Bei dem keramischen Material Macro-PrepCeramic Hydroxyapatit handelt es sich um eine sphärische, großporige Form von Hydroxyapatit, die durch Sintern bei hohen Temperaturen aus kristallinem Hydroxyapatit hergestellt wird (Partikelgröße 40 µm).

Die Proteinlösung wurde auf die Säule (C15/30, Pharmacia, Säulenvolumen 10.6 ml) aufgetragen, die zuvor mit Puffer E (10 mM KPi pH 7.8, 10 mM MSH, 10 % (V/V) Glycerol) äquilibriert wurde.

Die Säule wurde mit Puffer E gewaschen und gebundene Proteine mit einem linearen KPi-Gradienten, bestehend aus Puffer E und F (200 mM KPi pH 7.8, sonst wie Puffer E), eluiert.

1.9.4 Größenausschlußchromatographie an Superdex 75

Die Größenausschlußchromatographie trennt gelöste Moleküle nach ihrer Größe und basiert auf der unterschiedlichen Permeation der Proteine in ein poröses Trägermaterial mit kontrollierter Porengröße.

Das Gelfiltrationsmedium Superdex 75 besteht aus porösen, durch kovalent gebundene Dextranketten quervernetzten Agarose-Kügelchen. Der lineare Trennbereich für globuläre Proteine liegt für dieses Material zwischen 3 und 70 kDa, die Partikelgröße beträgt 13 µm.

Die Proteinlösung wurde auf die Superdex 75-Säule (HR 10/30, Pharmacia, Säulenvolumen 30 ml) aufgegeben, die zuvor mit Puffer B äquilibriert wurde.

Die Proteine wurden mit Puffer B eluiert (Flussrate 0.4 ml/min, Fraktionsgröße 0.5 ml/Fraktion).

Zur Bestimmung der relativen Molekülmasse (M_r) des Enzyms wurde die Säule mit Protein-Standards von 67, 45 und 29 kDa kalibriert.

1.9.5 Affinitätschromatographie an Ni-NTA

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen und reversiblen Adsorption eines Moleküls an einen individuellen, matrixgebundenen Bindungspartner.

Hier nutzt man die hohe Affinität der Aminosäure Histidin (an das zu reinigende Enzym wird N-Terminal gentechnisch eine Kette aus 6 Histidin Molekülen angefügt) zu Nickel²⁺-Ionen, welche durch einen Chelatkomplex mit NTA (nitrilotriacetic acid) an eine Agarose-Matrix gebunden sind.

Je nach zu reinigender Enzymmenge kamen 1 - 2 ml (Säule HR 10/2) oder bis zu 8 ml (Säule XK 16/20) Ni-NTA Material zum Einsatz.

Die Proteinlösung wurde auf die Säule (HR 10/2 oder XK 16/20, Volumen, 1 - 8 ml) aufgegeben, die zuvor mit Puffer a (50 mM KPi pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM MSH, 10 mM Imidazol) äquilibriert worden war.

Nach einem Waschschrift mit Puffer b (wie Puffer a, aber 20 mM Imidazol, Flussrate 0.5 ml/min, Fraktionsvolumen 8 ml) wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen Imidazolgradienten bestehend aus Puffer b und c (wie Puffer a aber 250 mM Imidazol) über 20 Säulenvolumen eluiert (Fraktionsgröße 1.5 ml/Fraktion).

2 Bestimmung der Enzymaktivität

Nach jedem säulenchromatographischen Reinigungsschritt musste die Enzymaktivität der Vinorin-Synthase in den gesammelten Fraktionen bestimmt werden. Als Testsystem stand ein einstufiger Test (Goldhammer 2001) mit Gardneral als Substrat zur Verfügung, der in abgewandelter Form (Puffer 0.1 M KPi pH 7 anstatt 40 mM Tris/HCl pH 7.8) angewandt wurde. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde nach dem Schema in Tabelle 8 pipettiert.

Tabelle 8: Standard-Enzymaktivitäts-Assay

Bestandteil	Volumen [μl]	Endkonz. [mM]	Absolute Konz. [nmol]
Gardneral (0.723 mM)	5 μl	0.035	3.57
Acetyl-CoA (3.6 mM)	20 μl	0.72	72
0.1 M KPi pH 7	ad 100 μl		
Enzymlösung	variabel		

Der Ansatz wurde 30 min bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert und anschließend die enzymatische Reaktion durch Reduktion der Aldehydgruppen mittels Zugabe von 2 μl 0.1 N HCl und 5 μl 1 %iger NaBH_4 -Lösung gestoppt. Nach Denaturierung der Proteine mit 200 μl MeOH und Zentrifugation für 5 min bei 14000 \times g wurde der Überstand zur quantitativen und qualitativen Bestimmung der Aktivität mittels HPLC (siehe Kapitel 3.3) analysiert.

3 Chromatographische und spektroskopische Methoden

3.1 Dünnschichtchromatographie

Für die Dünnschichtchromatographie wurden 0.2 mm dicke Kieselgel DC-Aluminiumplatten 60 F₂₅₄ (Merck) benutzt.

Das folgende Fließmittel wurde verwendet:

CHCl_3 : MeOH : NH_3 8 : 2 : 0.1

Die Detektion erfolgte unter UV-Licht bei 254 nm.

3.2 Massenspektrometrie zur Identifizierung des Enzymprodukts

Zur Strukturaufklärung des Enzymprodukts wurde die EI-MS-Methode angewandt.

Zu diesem Zweck wurde ein zwanzigfacher Inkubationsansatz eingesetzt. Nach 30 min wurde der Ansatz mit Ethylacetat extrahiert, die obere Phase eingedampft, in CHCl_2 : MeOH 1 : 1 aufgenommen und per DC analysiert.

Die im UV-Licht (254 nm) absorbierenden Flecken wurden ausgekratzt, mit CHCl_2 : MeOH 1:1 eluiert und nach verdampfen des Lösungsmittels direkt für die EI-MS-Analytik verwendet.

3.3 Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die HPLC wurde zur Bestimmung von Enzymaktivitäten eingesetzt.

Die Bestimmung der Aktivität der Vinorin-Synthase erfolgte unter den angegebenen Chromatographiebedingungen.

Chromatographiebedingungen:

Säule:	Lichrospher 60 RP-select B Säulengröße: 250 mm × 4 mm
Vorsäule:	RP-select B Säulengröße: 4 mm × 4 mm
Flussrate:	1.0 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Detektion:	UV 225 nm
Eluenten:	Eluent A: H_2O , pH 2.3 Eluent B: Acetonitril

Tabelle 9: HPLC-Gradient

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

4 Molekularbiologische Methoden

4.1 Nucleinsäure-Isolierung

4.1.1 Gesamt RNA-Isolierung

Sämtliche Arbeiten mit RNA wurden unter der Laminar Flow Box durchgeführt und alle Arbeitsflächen und Geräte zuvor mit RNase AWAY spray (Roth) behandelt.

400 mg 5 Tage alter *R. serpentina/Rhazya stricta* Hybrid-Zellen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und mit einem vorgekühlten Homogenisator in 5 ml peq GOLD RNAPure Lösung (PEQLAB) homogenisiert.

Das Gemisch wurde auf 2 ml Eppendorf-Caps verteilt und 10 min bei 18000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, jeweils in ein neues Eppendorf-Cap gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden jeweils 200 µl CHCl₃ zugefügt, gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (18000 x g, 4 °C, 15 min) wurde

die wässrige Phase abgenommen und mit 230 µl „Hochsalzlösung“ (1.2 M Natriumcitrat, 0.8 M NaCl) und 230 µl Isopropanol vorsichtig gemischt, bei RT 15 min stehen gelassen und zentrifugiert (20 min, 15000 x g, 4 °C). Das Pellet wurde zweimal vorsichtig mit 1 ml EtOH 70 % (V/V) gewaschen, vorsichtig für 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in 12 µl Wasser pro Pellet gelöst.

Die RNA konnte entweder direkt weiterverwendet oder bei -80 °C gelagert werden.

4.1.2 Plasmid-DNA-Minipräparation

Zur schnellen Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA diente die Methode von Birnboim und Doly (Birnboim und Doly 1979).

Hierzu wurden 2 ml einer Übernachtskultur der gewünschten Bakterienzellen durch Zentrifugation (5 min 35000 x g, 4 °C) geerntet. Das Pellet wurde in 125 µl Resuspendierungspuffer (25 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 50 mM Glucose) gelöst und 5 min bei RT inkubiert.

Zur Zell-Lyse wurden 270 µl frisch zubereitete basische SDS-Lösung (0.2 M NaOH, 1 % SDS) zugefügt, vorsichtig geschüttelt und die Mischung 5 min bei RT stehen gelassen. Durch Zugabe von 200 µl kalter Kaliumacetat-Lösung (60 ml 5 M Kaliumacetat, 11.5 ml Eisessig, 28.5 ml Wasser) wurden genomische DNA, Proteine und andere Zellbestandteile durch Zentrifugation (15 min, 18000 x g, 4 °C) abgetrennt. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen kalten Isopropanols gemischt und zentrifugiert (20 min, 18000 x g, 4 °C). Das Pellet wurde mit EtOH 70 % (V/V) gewaschen, vorsichtig luftgetrocknet und in 20 µl RNase A Lösung (Sambrook et al. 1989) resuspendiert.

4.1.3 Isolierung hochreiner Plasmid-DNA zur Sequenzierung

Zum Sequenzieren der Plasmid-DNA mit der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger (Sanger et al. 1992), (Sanger et al. 1977), durchgeführt durch die Firma GENterprise (Mainz), wurde die Plasmid-DNA mit dem

NucleoSpin Plasmid Kit (Qiagen) entsprechend den Anweisungen des Herstellers isoliert und aufgereinigt.

4.1.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Extraktion der DNA aus Agarosegelen wurde das NucleoSpin Extract Kit (Macherey Nagel, Düren), nach den Anweisungen des Herstellers, verwendet. Zuvor wurden die Banden mit sterilen Skalpellens aus dem Gel ausgeschnitten.

4.2 Elektrophorese von Nukleinsäuren

Die Elektrophorese von Nukleinsäuren wurde in einer horizontalen Apparatur durchgeführt (Blue Marine 100 oder 200, Serva), angeschlossen an ein Netzgerät (PowerPac 3000, BioRad).

4.2.1 DNA-Trennung

DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe wurden in einem 1 %igen Agarosegel (mit Ethidiumbromid zur Sichtbarmachung; 6 µl 10 mg/ml Lösung pro 100 ml Gel) getrennt (Sambrook et al. 1989).

Dazu wurde die Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA) aufgekocht, abkühlen gelassen und nach Zugabe des Ethidiumbromids in die Gelkammer gegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurde es in die Gelkammer gelegt und mit TAE-Puffer überschichtet. Die Proben wurden in die Taschen des Gels pipettiert und die Elektrophorese gestartet (Stromspannung 4 - 6 V/cm, Stromstärke variabel).

Die Elektrophorese wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Front etwa durch zwei Drittel des Gels gewandert war. (Bromphenolblau 0.25 % wurde zusammen mit Glycerin 30 % zu den Proben gegeben).

Das Abschätzen der Größe der DNA-Fragmente war möglich, da ein Größenstandard vor der Elektrophorese aufgetragen wurde (Smart Ladder).

4.2.2 RNA-Analyse

Die Gelapparatur und alle Arbeitsgeräte mussten vor Gebrauch 20 min in 3 %iger H₂O₂-Lösung geschwenkt und anschließend mit MeOH gespült werden, um von RNase befreit zu werden. Das Ansetzen aller Puffer erfolgte mit keimfreien Wasser (Aqua ad iniectabilia). Die Analyse der RNA wurde mit einem Formaldehyd-RNA Gel durchgeführt (Sambrook et al. 1989).

Die Gellösung (5 ml 10 x MOPS Puffer, 43 ml Wasser, 0.5 g Agarose) wurde aufgeköcht, abgekühlt auf 55 °C und mit 2.7 ml 37 % Formaldehyd versetzt.

2 - 4 µl RNA wurden mit 10 µl Probenpuffer versetzt und für 10 min auf 65 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben in die Kämme pipettiert, mit 1 x MOPS Puffer überschichtet und die Gelelektrophorese gestartet.

10 x MOPS-Puffer:	Probenpuffer:
200 mM Mops	60 µl Formamid
50 mM NaOAc	20 µl 10x MOPS Puffer
10 mM EDTA	32.5 µl 37 % Formaldehyd
pH auf 6.5-7 mit NaOH einstellen	12.5 µl Wasser
Sterilfiltrieren	12.5µl Ethidiumbromid (10 mg/ml)
	10 µl Glycerol
	10 µl gesättigte Bromphenolblau-Lösung

4.3 Amplifizieren von Nukleinsäuren

4.3.1 cDNA-Synthese

Aus der Gesamt-m-RNA wurde mit Hilfe der RNA-abhängigen M-MLV Reversen Transkriptase (Gibco) einzelsträngige cDNA hergestellt, die als Matrize für die PCR eingesetzt werden konnte.

Der Reaktionsansatz bestand aus den folgenden Komponenten: 4 µl Gesamtm-RNA, 1 µl Oligo dT-Primer (10 pmol/µl), 4 µl 5x 1st Strand-Puffer, 2 µl 0.1 M DTT, 2 µl dNTP Mischung (20 mM, jedes 5 mM), 6 µl Wasser.

Nach 5 min Inkubation bei 65 °C wurde die Mischung auf 37 °C abgekühlt und 1 µl M-MLV zugefügt. Die Temperatur von 37 °C wurde eine Stunde beibehalten. Die cDNA-Synthese wurde nach 5 min Inkubation bei 95 °C abgeschlossen.

4.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR nach Mullis (Mullis 1990), (Saiki et al. 1988) ist eine effiziente und einfache Methode, DNA zu amplifizieren.

Benötigt wird eine DNA-Matrize (Template). Als Template kann genomische DNA, cDNA und Plasmid-DNA verwendet werden. Es können nur DNA-Bereiche zwischen bekannten Nukleotidsequenzen amplifiziert werden. Für diese bekannten Nukleotidsequenzen werden Primer synthetisiert, die sich optimal an die bekannten Sequenzen anlagern können. Die Primer und das Template werden zusammen in einer Pufferlösung mit den vier dNTPs und einer thermostabilen DNA-Polymerase vermischt. Zunächst wird die Mischung im Thermocycler für 5 min auf 95 °C erhitzt, um alle DNA-Bereiche zu Einzelsträngen zu denaturieren. Danach wird die Temperatur auf einen Bereich gesenkt, in dem die Primer optimal mit der Ziel-DNA hybridisieren können. Im nächsten Schritt wird die Inkubationstemperatur auf etwa 72 °C angehoben, da bei dieser Temperatur die DNA-Polymerasen optimal arbeiten. Diese Amplifikationsrunden können beliebig häufig wiederholt werden, doch nimmt die Effizienz der PCR nach etwa 20 Zyklen kontinuierlich ab.

Die PCR zur Gewinnung des ersten cDNA-Fragmentes der Vinorin-Synthase wurde mit der *Taq*-DNA-Polymerase von Gibco durchgeführt unter folgenden Bedingungen : 3x (94 °C 30 s, 40 °C 1 min, 72 °C 1.5 min) 30x (94 °C 30 s, 58 °C 1 min, 72 °C 1.5 min). Der Reaktionsansatz bestand aus folgenden Komponenten: 3 µl Template, je 1 µl forward und reverse Primer (10 pmol/µl), 16 µl Wasser, 2µl PCR-Puffer, 1µl dNTP`s (5 mM jedes), 1µl MgCl₂, 0.3 µl *Taq*- Polymerase.

Der Vollängenklon wurde amplifiziert mit der Advantage cDNA-Polymerase von Clontech unter den folgenden Bedingungen: 1x (94 °C 5 min), 35x (94 °C 1 min, 55 °C 1.5 min, 72 °C 5 min). Der Reaktionsansatz bestand aus den folgenden Komponenten: 2 µl Template, je 1 µl forward und reverse Primer (10 pmol/µl), 1.5 µl dNTP`s (10 mM jedes), 5µl Advantage Polymerase-Puffer, 1 µl Advantage DNA-Polymerase, 39.5 µl Wasser.

Die Mutationen der Vinorin-Synthase wurden gemäß den Anleitungen des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) unter Verwendung des Enzyms *Pfu Turbo*-Polymerase (Stratagene) durchgeführt. Die Bedingungen wurden wie folgt gewählt: 1x 95 °C 30 s, 16x (95 °C 30 s, 55 °C 1 min, 68 °C 6 min).

Reaktionsansatz: 3 µl Template, je 1 µl forward und reverse Primer (10 pmol/µl), 5µl 10x PCR-Puffer, 1 µl dNTPs (5 mM jedes), 1 µl *Pfu Turbo*, 38 µl Wasser.

4.3.3 RACE-PCR (Rapid amplification of cDNA ends)

Mit der RACE-PCR ist es möglich, gezielt sowohl das 3`- als auch das 5`-Ende eines Gens zu amplifizieren. Die RACE-PCR wurde durchgeführt mit dem GeneRacer Kit (Invitrogen) gemäß den Anleitungen des Herstellers unter den folgenden Bedingungen: 1x 94 °C 2 min, 5x (94 °C 30 s, 72 °C 1 min), 5x (94 °C 30 s, 70 °C 30 s, 72 °C 1 min), 20x (94 °C 30 s, 68 °C 30 s, 72 °C 1 min), 1x 72 °C 10 min

Reaktionsansatz : 1 µl Template, 1 µl genspezifischer Primer (10 pmol/L), 1 µl RACE-Primer (3`oder 5`), 0.5 µl Advantage cDNA-Polymerase (Clontech), 5 µl 10 x PCR-Puffer, 1 µl dNTPs (10 mM jedes), 40.5 µl Wasser.

4.4 Klonieren von cDNA-Fragmenten

4.4.1 Ligation in einen Vektor

Ligationen dienen dazu, DNA-Stücke miteinander zu verbinden. Hierzu wurden T₄ DNA-Ligase und der mitgelieferte 10x Ligase-Puffer eingesetzt. Die Reaktionen wurden bei 16 °C über Nacht durchgeführt.

Die cDNA-Fragmente der Vinorin-Synthase, die mit der *Taq*-DNA-Polymerase amplifiziert wurden und die Fragmente, die bei der RACE-PCR erhalten wurden, wurden in den pGEM-T easy Klonierungsvektor (Promega) ligiert.

Reaktionsansatz: 7 µl DNA (aus einem Gel extrahiert), 1 µl Ligase-Puffer, 1 µl T₄ DNA-Ligase, 1 µl Vektor.

Der Vinorin-Synthase-Vollängenklon wurde direkt in den pQE2 Expressionsvektor (Qiagen) einligiert (wie oben). Hierzu mussten sowohl der Vektor als auch der Vollängenklon mit den Restriktionsenzymen *Sac* I und *Nde* I vorverdaut werden (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10: Verdau des Vinorin-Synthase-Vollängenklons und des Vektors pQE2 vor der Ligation

Verdau Vollängenklon	Verdau Vektor
15 µl DNA VL (1000 ng)	5 µl pQE2
5 µl Puffer 2 (NEB)	5 µl Puffer 2 (NEB)
5 µl BSA (zehnfach verdünnt)	5 µl BSA (zehnfach verdünnt)
3 µl <i>Sac</i> I	3 µl <i>Sac</i> I
3 µl <i>Nde</i> I	3 µl <i>Nde</i> I
19 µl Wasser	19 µl Wasser

Die Mischungen wurden 3 h bei 37 °C inkubiert, mittels Gelelektrophorese getrennt, aus dem Gel eluiert (siehe Kapitel 4.1.4) und anschließend nach der oben beschriebenen Prozedur ligiert.

4.4.2 Transformation

Transformation ist die Übertragung von DNA auf kompetente Zellen z.B. *E. coli*-Stämme.

Zur Transformation kamen entweder stark verdünnte Plasmid-Lösungen (1 : 100) oder komplette Ligationsansätze zum Einsatz.

Zu diesem Zweck wurden kompetente Bakterienzellen (gelagert bei -80 °C) vorsichtig auf Eis angetaut und 35 µl zum Ligationsansatz (10 µl) oder der verdünnten Plasmid-Lösung (10 µl) hinzugegeben. Die Mischung wurde 30 min auf Eis gelagert inkubiert und dann schnell für 90 s auf 37 °C erwärmt (Hitzeschock). Anschließend wurde die Mischung erneut für 2 min auf Eis gekühlt und dann mit 400 µl LB-Medium vermischt. Die Zellen wurden eine Stunde bei 37 °C inkubiert und auf LB-Agar-Platten (mit Ampicillin 100 µg/ml bei TOP10-Zellen und Ampicillin + 25 µg/ml Kanamycin bei M15-Zellen) ausplattiert.

4.4.3 Herstellen von kompetenten Zellen

Für das Herstellen von kompetenten Zellen wurde eine Methode von Hanahan (Hanahan 1985) verwendet. Eine monoklonale Bakterienkolonie (TOP10, M15) wurde in 100 ml LB-Medium (bei M15-Zellen wurde Kanamycin zugesetzt) bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 wachsen gelassen. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4000 x g und 4 °C wurde das Pellet in 30 ml Tfb1-Buffer resuspendiert. Die Zellen wurden für 90 min auf Eis gekühlt und erneut unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Die Zellen mussten von nun an immer sehr vorsichtig behandelt und auf Eis gelagert werden. Das Pellet wurde in 4 ml eiskaltem Tfb2-Puffer aufgenommen, die Mischung wurde vorsichtig aliquotiert (150 µl), sofort mit flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

4.4.4 Expression in Bakterienzellen

Zur Expression der Vinorin-Synthase wurde das Vinorin-Synthase pQE2-Konstrukt (siehe Kapitel 4.4.1) in M15 *E. coli*-Zellen benutzt. Die genaue Prozedur ist in 1.2. beschrieben.

4.4.5 Entfernen des N-Terminalen His-tags

Der 6x Histidin-tag, den die Vinorin-Synthase durch Ligation in den pQE2 Vektor besitzt (Vektor codiert für 6x Histidin-tag) (siehe Abbildung 5) wurde mit dem TAGzyme Kit „for Exoproteolytic cleavage of N-terminal His tags“ (Qiagen) mit dem Enzym DAPase (Qiagen), nach den Anleitungen des Herstellers, abgespalten (siehe Abbildung 6).

Vor dem Abspalten des His-tags musste die nach 1.9.5 gereinigte Proteinlösung gegen TAGzyme-Puffer (20 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl pH 7) dialysiert werden.

Für kleinere Proteinmengen (bis 50 µg) werden 5 µl Cysteamin-HCl (2 mM) und 2.5 µl DAPase (1 U/ml), nach einer Vorinkubationszeit von 10 min, zur Proteinlösung gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der Lösung 50 µl Ni-NTA-Agarose-Material (Qiagen) zugegeben und die Lösung 10 min bei 4 °C geschüttelt. Nach Zentrifugation (10 s) bei 14000 x g wurde der Überstand abgenommen.

Für größere Proteinmengen, die zur Kristallisation benötigt wurden, setzte sich der Reaktionsansatz wie folgt zusammen: 1250 µl Proteinlösung (4 mg/ml), 25µl DAPase (10 U/ml), 25 µl Cysteamin-HCl (20 mM). Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei 37 °C, wurde die Lösung zum Entfernen der DAPase, auf eine selbstgepackte Säule mit 5 ml Ni-NTA-Agarose-Material (äquilibriert mit 50 ml 1x TAGZyme-Puffer) aufgegeben. Der Durchfluss der Säule wurde fraktionsweise aufgefangen. Es wurde solange mit TAGZyme-Puffer eluiert, bis im Durchfluss kein Protein mehr enthalten war. Die Protein-Fractionen wurden vereint und gegen 10 mM Tris-HCl Puffer (pH 7.8 mit 10 mM MSH) dialysiert.

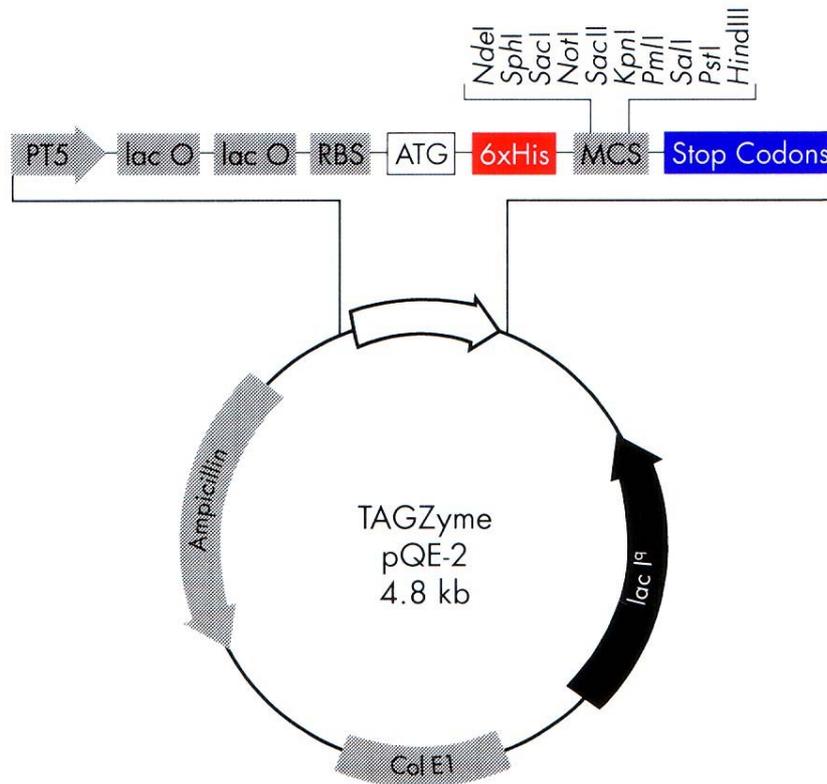


Abbildung 5: pQE2-Vektor

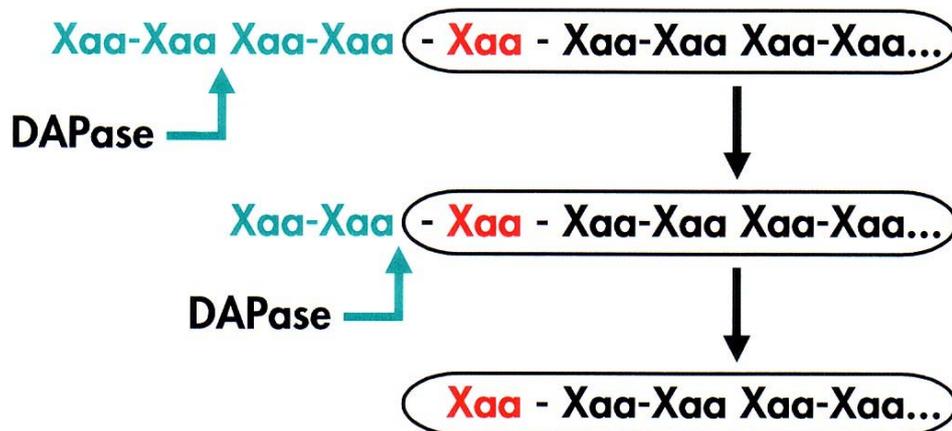


Abbildung 6: His-tag-Abspaltung

Die nicht eingekreisten Buchstaben symbolisieren den His-tag, die ersten eingekreisten Buchstaben symbolisieren den internen Stoppunkt und die restlichen eingekreisten Buchstaben symbolisieren die Protein-Sequenz. Die DAPase verdaut die Dipeptide bis der interne Stoppunkt erreicht ist.

5 Kristallisation

Vor der Kristallisation wurde die nach 4.4.5 erhaltene Proteinlösung mit einem Centriprep YM10 Konzentrator bis auf 900 μ l (14 mg/ml) konzentriert. Die Lösung wurde kurz vor Gebrauch mit der Überstandslösung, die beim Konzentrieren abgenommen wurde, auf die gewünschte Konzentration verdünnt.

Für die Kristallisation wurden zunächst die Puffer des Crystal Screen und Crystal-Screen 2 Kit (Hampton Research) benutzt. Bei der angewandten „hanging-drop“-Methode wurden 3 μ l Proteinlösung (2 mg/ml) und 3 μ l Fällungspuffer auf einem Deckgläschen vermischt und dann über ein Reservoir gegeben, in dem sich 700 μ l desselben Fällungspuffers befinden. Dieses Reservoir auf dem das Deckgläschen aufsitzt wurde luftdicht mit Silikon verschlossen.

Die Kristallisationsansätze wurden bei RT und 32 °C gelagert und jeweils nach 5 Tagen mikroskopisch kontrolliert.

Nach Auswertung der Kristallisationsansätze wurden die Bedingungen weiter optimiert und 2 selbstentwickelte „Screenings“ mit insgesamt 160 Fällungspuffern durchgeführt (siehe Abschnitt IV).

5.1 Selenomethionin-Methode

Die Expression der mit Selenomethionin markierten Vinorin-Synthase wurde nach Van Duyne (Van Duyne et al. 1993) mit dem in 4.4.4 beschriebenen *E.coli* Expressionssystem durchgeführt.

1 ml einer über Nacht gewachsenen Kultur des Vinorin-Synthase pQE2-Konstruktes in M15 *E. coli*-Zellen wurde zentrifugiert (14000 x g, 2 min), in 1 ml vorgewärmten (30 °C) M9-Medium rückgelöst und anschließend in 500 ml M9-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von 0.3 bei RT inkubiert. Je nach Bedarf an Proteinmenge wurden unterschiedliche Mengen M9-Medium verwendet (3 - 7 Liter). Danach erfolgte die Zugabe von je 100 mg/l Lysin,

Phenylalanin, Selenomethionin und Threonin sowie 50 mg/l Isoleucin, Leucin und Valin. Nach 50 min wurden die Zellen mit 0.5 mM IPTG versetzt und für weitere 20 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und weiterverarbeitet wie in 1.2 beschrieben (Resuspendierungspuffer enthielt zusätzlich 1 mM DTT). Dann wurde mit der Proteinlösung eine Reinigung an der Ni-NTA-Säule durchgeführt (siehe Kapitel 1.9.5) und anschließend der His-tag abgespalten (siehe Kapitel III.4.4.5.). Die Proteinlösung wurde dialysiert (10 mM Tris-HCl pH 7.8, 5 mM DTT, 10 mM MSH), konzentriert und zur Kristallisation verwandt.

5x M9-Stock (1 L):75.7 g NaHPO₄x12 H₂O15 g KH₂PO₄5 g NH₄Cl

2.5 g NaCl

autoklaviert

1 L M9-Medium :

(100 µg/ml Amp. und 25 µg/ml Kan.)

800 ml H₂O (autoklaviert)

200 ml 5x M9-Stock

1 ml 1 M MgSO₄ (autoklaviert)

20 ml 40% (w/v) Glucose (sterilfiltriert)

100 ml 0.5% Thiamin-Vitamin (sterilfiltriert)

III ERGEBNISSE

1 Nachweis der Vinorin-Synthase

Zur erfolgreichen Entwicklung eines Reinigungsschemas für ein Enzym ist es wichtig, seine biologische Aktivität in der Vielfalt der anderen Proteine zu erkennen. Die biologische Aktivität hängt von einer Reihe von Faktoren ab, wie z.B. Temperatur und Pufferzusammensetzung. Aus diesem Grund muss nach jeder Phase der Proteinreinigung die Aktivität getestet werden und auf ihren Erhalt geachtet werden. Die Messung der enzymatischen Aktivität gibt die Möglichkeit, die Reinigung eines Proteins genau zu verfolgen.

Aus den oben genannten Gründen wurde nach jedem Reinigungsschritt die Aktivität der Vinorin-Synthase bestimmt und so geeignete Fraktionen für den nächsten Reinigungsschritt ausgewählt.

1.1 Enzymassay der Vinorin-Synthase

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde der von Goldhammer (Goldhammer 2001) entwickelte Test optimiert.

Die Vinorin-Synthase katalysiert die Umwandlung von 16-epi-Vellosimin zu Vinorin in einer Acetyl-CoA-abhängigen Reaktion. Das natürliche Substrat epimerisiert jedoch bei dem für den Enzymtest benötigten pH-Wert von 7-8 innerhalb von 20 min. Das Epimer (Vellosimin) wird vom Enzym nicht mehr als Substrat akzeptiert. Aus diesem Grund ist 16-epi-Vellosimin [K_M 19.4 μ M] ungeeignet zur Bestimmung der Enzymaktivität der Vinorin-Synthase. Die Vinorin-Synthase ist sehr substratspezifisch (Pfitzner 1984). Neben ihrem natürlichen Substrat akzeptiert sie nur das 11-Methoxy-Derivat Gardneral (siehe Abbildung 7). Dies zeigt eine deutlich geringere Tendenz zur Epimerisierung und wird deshalb im folgenden für alle Enzymtests eingesetzt.

Das verwendete Gardneral wurde synthetisch von Professor Sakai (Japan) hergestellt.

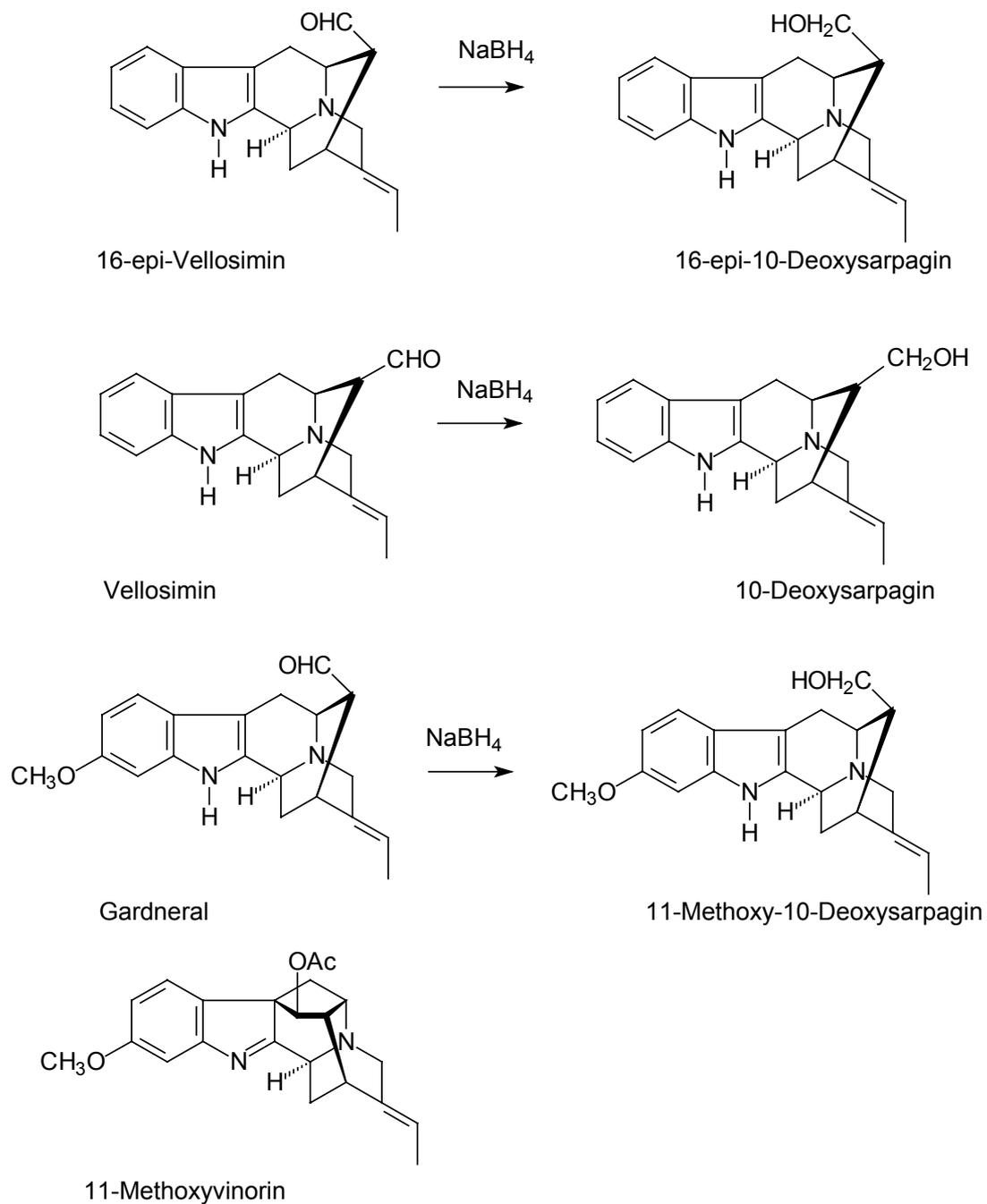


Abbildung 7: Mögliche Substrate der Vinorin-Synthese, deren Reduktionsprodukte mit NaBH_4 sowie das Produkt der Inkubation

Die Inkubation erfolgte wie in Kapitel 2 beschrieben. Zur Verbesserung der Trennung der Aldehyde wurde mit Natriumborhydrid zu den entsprechenden

Alkoholen reduziert (siehe Abbildung 7) und das Produkt mittels HPLC quantifiziert (siehe Abbildung 8).

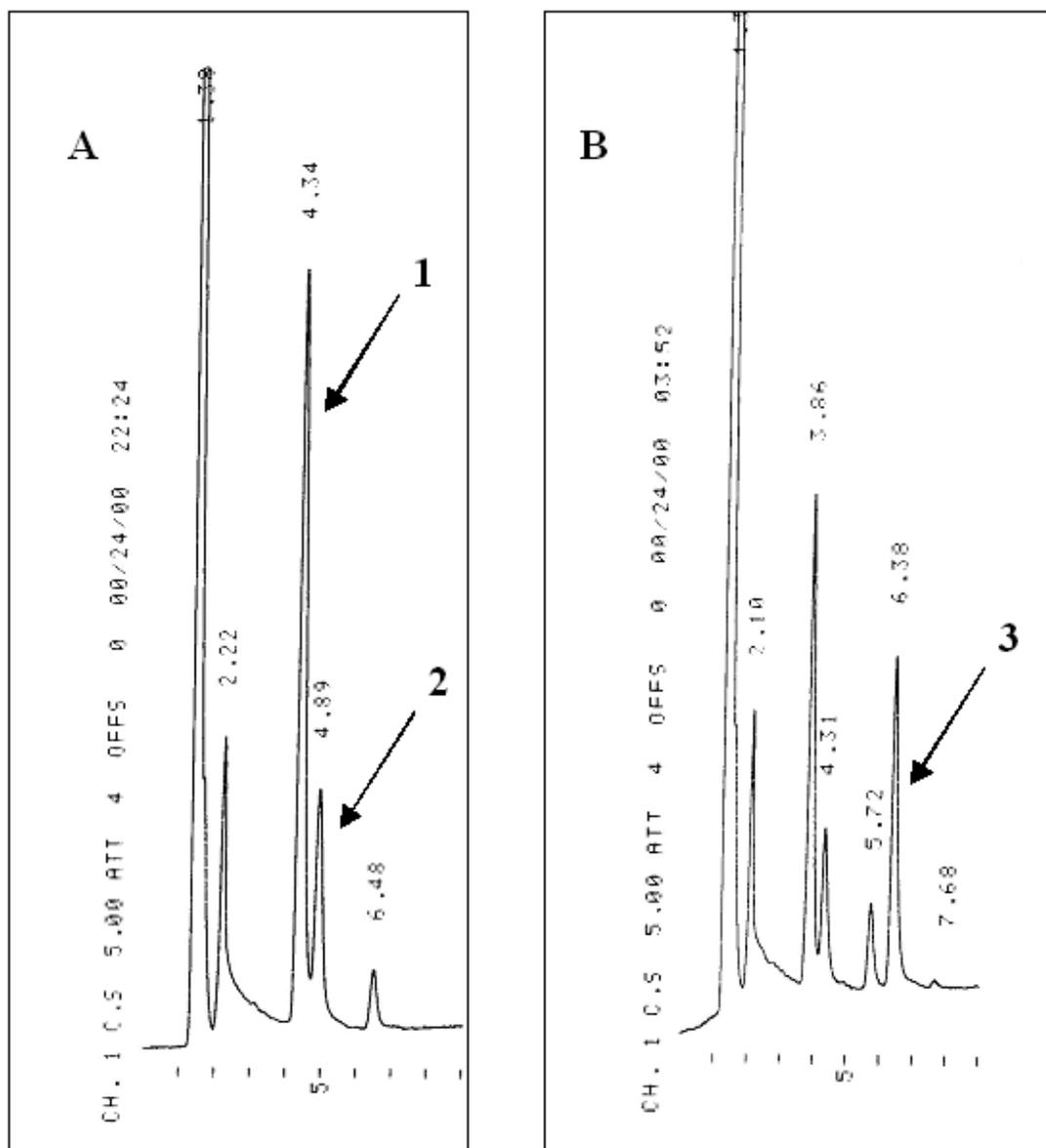


Abbildung 8: HPLC-Chromatogramme der Aktivitätsassays für die Vinorin-Synthase mit dem Substrat Gardneral.

A Assay ohne Enzym

B Assay mit Enzymaktivität

Formeln siehe Abbildung 7

1 16-epi-11-Methoxy-10-Deoxysarpagin

2 11-Methoxy-10-Deoxysarpagin

3 11-Methoxy-Vinorin

Die Retentionszeiten betragen für die Reduktionsprodukte der Alkaloide Gardneral (1) 3.86 min, epi-Gardneral (2) 4.31 min und 11-Methoxy-Vinorin (3) 6.38 min

Dieser schnelle, optimierte Enzymtest machte es möglich, die enzymatische Aktivität der Vinorin-Synthase nach jedem Reinigungsschritt zu verfolgen und die Trennleistung der Säule zu beurteilen.

2 Reinigung der Vinorin-Synthase

Für die Vinorin-Synthase wurde ein Reinigungsschema erarbeitet, das im folgenden dargestellt wird. Um eine Enzymdegradierung während der Reinigung zu vermeiden und die Aktivität der Vinorin-Synthase aufrecht zu erhalten, wurde allen Puffern Mercaptoethanol, Glycerol und Polyvinylpyrrolidon zugefügt.

Der Erfolg eines jeden Reinigungsschrittes wurde durch SDS-Gele und Aktivitätstests beurteilt. Das Reinigungsschema besteht aus fünf säulenchromatographischen Reinigungsschritten. Mit diesem Schema war es möglich, das Enzym so weit aufzureinigen, dass am Ende nur noch wenige Protein-Banden auf dem Gel zu erkennen waren. Eine Bande konnte aufgrund des Aktivitätsprofils eindeutig der Vinorin-Synthase zugeordnet werden (siehe Abbildung 9).

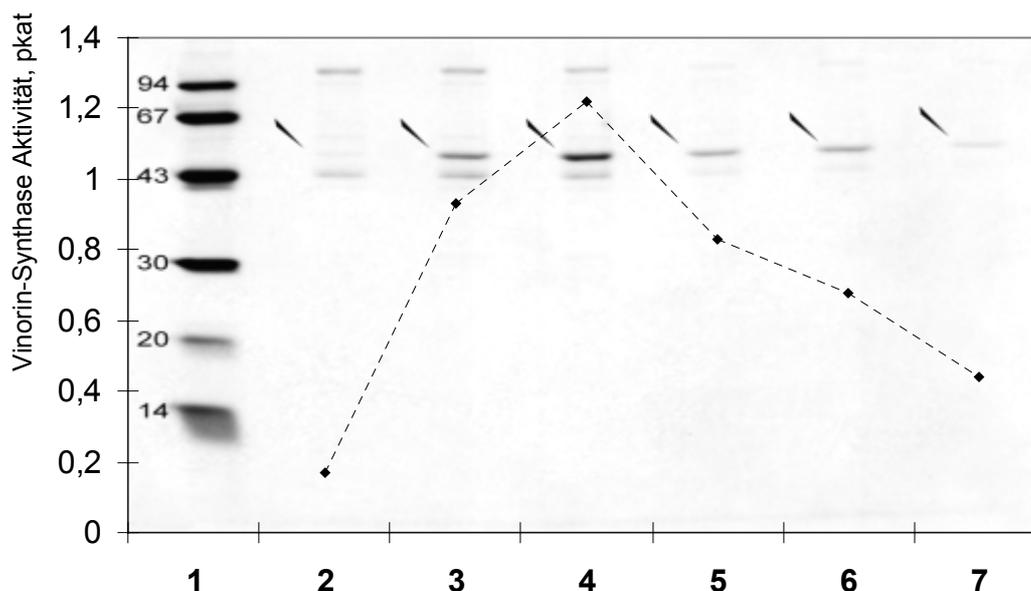


Abbildung 9: Coomassie-Blau gefärbtes SDS-Gel mit Aktivitätsprofil nach dem letzten Reinigungsschritt an Superdex75 (gestrichelte Linie gibt die Aktivität der Vinorin-Synthase wieder).

Bahn 1 ist ein Größen-Standard, Bahnen 2 - 7: Proteinlösung nach Superdex 75. Die Bande, die der Vinorin-Synthase zugeordnet wurde, ist mit Pfeilen gekennzeichnet.

2.1 Aufschluss der *Rauvolfia*-Zellen und fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung

Zur Gewinnung der Vinorin-Synthase wurden 2 kg *Rauvolfia*-Zellen der Linie *RauvolfiaxRhazya*, wie in 1.1 beschrieben, aufgeschlossen. Der Proteinextrakt, der so erhalten wurde, hatte eine Konzentration von 2.5 mg/ml und wies eine spezifische Aktivität von 0.1 nkat/mg auf. Die erste fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung bis zu einer Konzentration von 40 % diente der Abtrennung der in der Lösung vorhandenen Mikrosomen. Nach der zweiten Fällung (bis 60 %) wurde das Präzipitat in 200 ml Puffer B (1.1.) gelöst, zentrifugiert und der Überstand nach Entsalzung über G25-Säulenmaterial für die nachfolgende chromatographische Reinigung eingesetzt.

2.2 Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q

Die durch die Ammoniumsulfatfällung erhaltene Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 20 ml/min auf eine selbst gepackte Source 30Q-Säule (Eigenschaften und Bedingungen siehe 1.9.1.1) gegeben.

Die Trennung erfolgte bei pH 8,0, also etwa 3,5 pH-Einheiten über dem von Pfitzner (Pfitzner et al. 1986) mittels Chromatofokussierung bestimmten isoelektrischen Punkt der Vinorin-Synthase. Bei diesem pH Wert liegt eine ausreichend hohe Nettoladung der Vinorin-Synthase für die Trennung vor.

Es wurde mit einem KCl-Gradienten von 0 - 0,5 M eluiert und das Eluat in 12 ml Fraktionen aufgefangen. Das Maximum der spezifischen Aktivität lag bei 0,15 M KCl und betrug 0,4 nkat/mg. Fraktionen mit einer spezifischen Aktivität von über 0,1 nkat/mg wurden vereinigt und für den nächsten Säulenchromatographischen Reinigungsschritt an SOURCE 15PHE eingesetzt. Das Elutionsprofil lässt erkennen, dass mit diesem ersten Trennungsschritt durch Anionenaustauschchromatographie schon eine große Menge an Fremdproteinen abgetrennt wurde (siehe Abbildung 10).

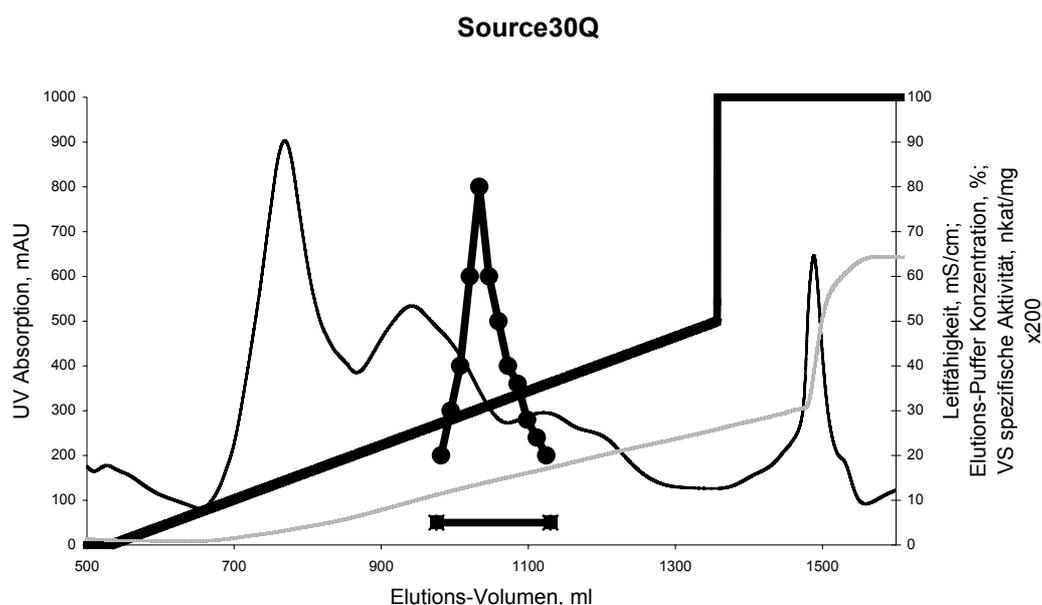


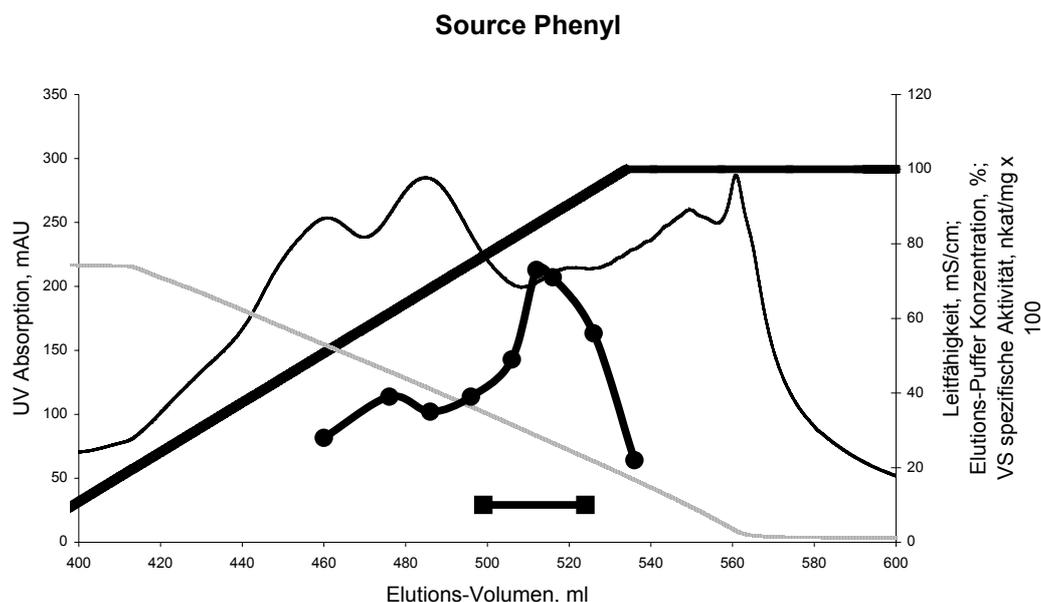
Abbildung 10: Reinigung der Vinorin-Synthase durch Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q (Elutionsprofil)

—————	Elutions-Puffer-Konzentration
—————	UV280
.....	Leitfähigkeit

Die Linie mit den Kreisen symbolisiert die spezifische Aktivität der Vinorin-Synthase; die Linie mit den Quadraten steht für die gesammelten Fraktionen.

2.3 Hydrophobe Interaktions-Chromatographie an SOURCE 15PHE

Die Fraktionen, die nach der Anionenaustauschchromatographie eine spezifische Aktivität von > 0.1 nkat/mg aufwiesen, wurden mit Ammoniumsulfat bis zu einer Konzentration von 40 % versetzt und auf die SOURCE 15 PHE-Säule (Bedingungen und Eigenschaften siehe 1.9.2) mit einer Flussrate von 5 ml/min gegeben. Nach dem Waschen der Säule wurden die gebundenen Proteine mit einem absteigenden Ammoniumsulfat-Gradienten (1 - 0 M) eluiert und in Fraktionen zu 5 ml aufgefangen. Das Maximum der spezifischen Aktivität lag bei 0.22 M Ammoniumsulfat und 0.7 nkat/mg. Die Fraktionen, die eine spezifische Aktivität von > 0.2 nkat/mg aufwiesen, wurden vereinigt (30 ml) und an einer G25 Säule entsalzt. Auch das Elutionsprofil dieser Säule lässt eine gute Abtrennung von Fremdproteinen erkennen (siehe Abbildung 11).



**Abbildung 11: Reinigung der Vinorin-Synthase durch Hydrophobe Interaktionen
Chromatographie an SOURCE 15PHE (Elutionsprofil)**

- Elutions-Puffer-Konzentration
- UV280
- Leitfähigkeit

Die Linie mit den Kreisen symbolisiert die spezifische Aktivität der Vinorin-Synthase; die Linie mit den Quadraten steht für die gesammelten Fraktionen.

2.4 Chromatographie an Hydroxyapatit

Die vereinten aktiven Fraktionen nach der SOURCE 15PHE-Säule wurden mit einer Flussrate von 5 ml/min auf eine Macro-Prep Hydroxyapatit-Säule aufgegeben (Eigenschaften und Bedingungen siehe 1.9.3).

Nach dem Waschen der Säule wurden die gebundenen Proteine mit einem linear aufsteigenden KPi-Gradienten (0.01 - 0.2 M) eluiert und Fraktionen mit einer Größe von 3 ml gesammelt. Fraktionen mit einer spezifischen Aktivität von bis 0.3 - 3 nkat/mg wurden vereint (15 ml) und für den nächsten Reinigungsschritt verwendet. Das Maximum der spezifischen Aktivität liegt bei 3.56 nkat/mg. Auch bei diesem Reinigungsschritt ist zu erkennen, dass die

Hauptmenge der Fremdproteine abgetrennt wurde, so dass bei einer Ausbeute von 1 % eine 36fache Anreicherung der spezifischen Aktivität der Vinorin-Synthase auf 3.56 nkat/mg erzielt werden konnte (siehe Abbildung 12).

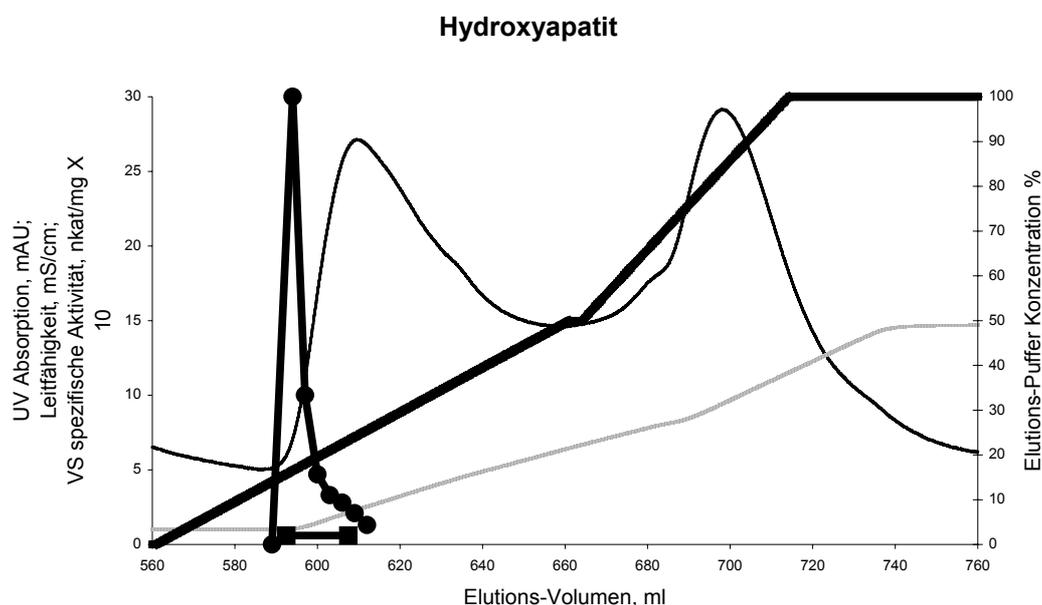
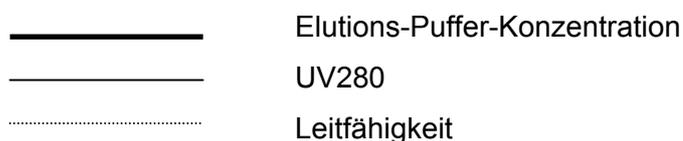


Abbildung 12: Reinigung der Vinorin-Synthase durch Chromatographie an Hydroxyapatit (Elutionsprofil)



Die Linie mit den Kreisen symbolisiert die spezifische Aktivität der Vinorin-Synthase; die Linie mit den Quadraten steht für die gesammelten Fraktionen.

2.5 Anionenaustauschchromatographie an Mono Q

Die nach der Reinigung an Hydroxylapatit erhaltenen vereinigten aktiven Fraktionen wurden mit einer Flussrate von 1 ml/min auf eine Mono Q-Säule gegeben (Bedingungen und Eigenschaften siehe 1.9.1.2). Nach dem Waschen der Säule wurden die gebundenen Proteine mit einem KCl-Gradienten von 0 - 0.15 M innerhalb der ersten 6 min, 0.15 - 0.45 M innerhalb der nächsten 24 min und 0.45 - 0.5 M innerhalb der letzten 5 min eluiert und

in 1 ml Fraktionen gesammelt. Fraktionen mit einer Aktivität > 3 nkat/mg wurden vereint und für den letzten chromatographischen Reinigungsschritt verwendet. Das Maximum der spezifischen Aktivität lag bei 7.5 nkat/mg und 0.125 M KCl. Bei einer Ausbeute von 0.3 % konnte eine 55fache Anreicherung der spezifischen Aktivität der Vinorin-Synthase auf 5.4 nkat/mg erzielt werden. Die vereinten Fraktionen (3 ml) wurden mit Microcon 30 (Amicon) Konzentratoren auf ein Volumen von 100 μ l konzentriert (siehe Abbildung 13).

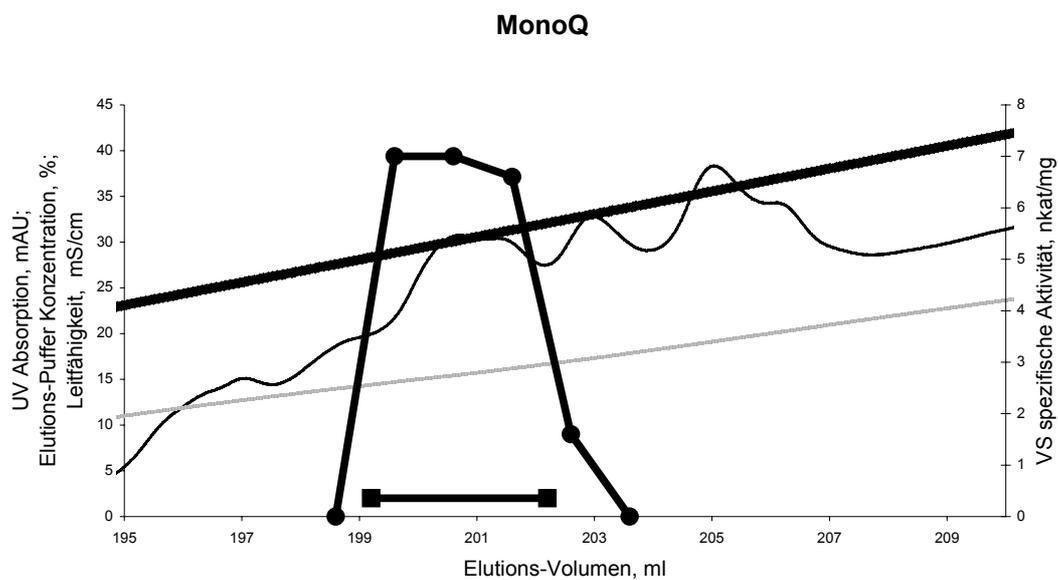


Abbildung 13: Reinigung der Vinorin-Synthase durch Chromatographie an Mono Q (Elutionsprofil)

————— Elutions-Puffer-Konzentration
 ————— UV280
 Leitfähigkeit

Die Linie mit den Kreisen symbolisiert die spezifische Aktivität der Vinorin-Synthase; die Linie mit den Quadraten steht für die gesammelten Fraktionen.

2.6 Größenausschlusschromatographie an Superdex 75

Die Größenausschlusschromatographie wurde sowohl zur Reinigung als auch zur Bestimmung des Molekulargewichts der Vinorin-Synthase eingesetzt. In diesem letzten Reinigungsschritt wurde die konzentrierte Proteinlösung mit einer Flussrate von 0.4 ml/min auf eine Superdex 75 Säule gegeben (Bedingungen und Eigenschaften siehe 1.9.4). Zur Bestimmung des relativen Molekulargewichtes (M_r) wurde die Säule mit Protein-Standards von 67, 45 und 29 kDa kalibriert. Das Molekulargewicht der Vinorin-Synthase wurde durch die Größenausschlusschromatographie mit 45 kDa bestimmt. Dieses Ergebnis wurde auch durch SDS-Gelelektrophorese überprüft. Das Maximum der Vinorin-Synthase Aktivität lag bei 12.7 ml und 99.1 nkat/mg, was einer 99.1fachen Anreicherung entspricht (siehe Abbildung 14).

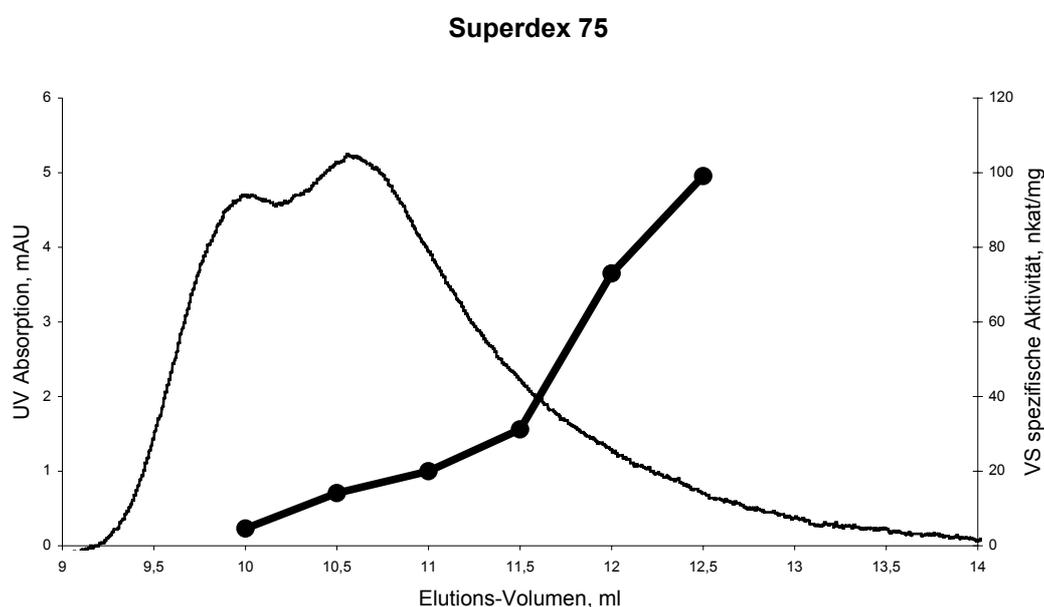


Abbildung 14: Reinigung der Vinorin-Synthase durch Chromatographie an Superdex 75 (Elutionsprofil)

UV280

Die Linie mit den Kreisen symbolisiert die spezifische Aktivität der Vinorin-Synthase

Nach den fünf Reinigungsschritten ergab sich folgendes Reinigungsprotokoll.

Tabelle 11: Reinigungsprotokoll der Vinorin-Synthase

Reinigungs-Schritt	Volumen (ml)	Protein-menge (mg)	Ausbeute (%)	Spez. Aktivität (nkat·mg ⁻¹)	Anreicherungs-Faktor
Rohextrakt	2500	6250	100	0.10	1
SOURCE 30Q	144	245	7.8	0.20	2
SOURCE PHE	30	28	2.5	0.55	5.5
Hydroxyapatit	15	1.7	1.0	3.56	36
MonoQ	3	0.3	0.3	5.47	55
Superdex 75	0.5	0.01	0.2	99.10	991

2.7 SDS-gelelektrophoretische Kontrolle der Enzymreinigung

Der Verlauf der fünfstufigen Proteinreinigung wurde SDS-gelelektrophoretisch verfolgt.

50 µl der erhaltenen Proteinlösung nach Hydroxyapatit und Mono Q wurden mit je 50 µl Probenpuffer versetzt und wie in 1.7.1 beschrieben SDS-gelelektrophoretisch analysiert. Auf dem Gel ist zu erkennen, dass schon ein Großteil der Fremdproteine abgetrennt wurde und eine Bande bei etwa 50 kDa jetzt schon der Vinorin-Synthase zuzuordnen ist (siehe Abbildung 15).

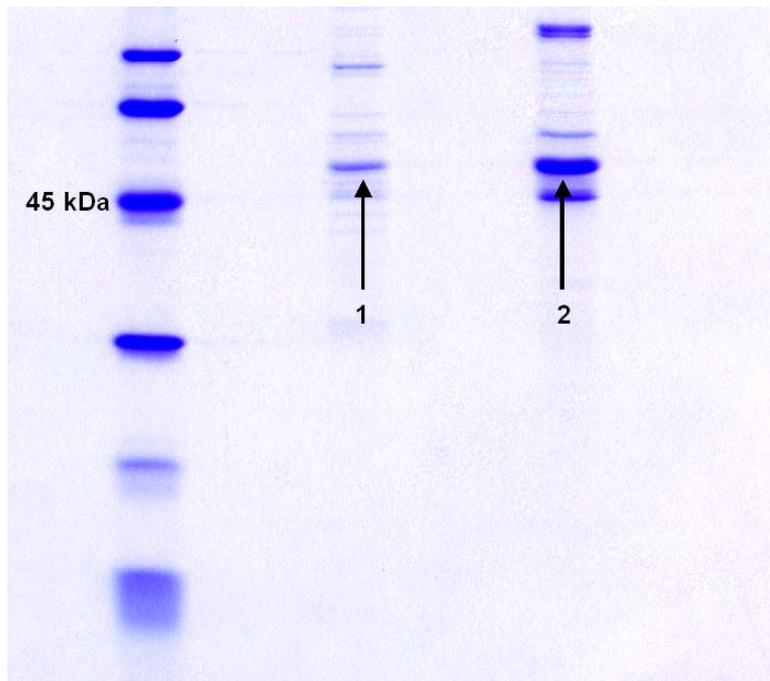


Abbildung 15: SDS-Gel der Fraktionen nach Hydroxyapatit und Mono Q.

- 1 Fraktion nach Mono Q
- 2 Fraktion nach Hydroxylapatit

Nach dem letzten Reinigungsschritt an Superdex 75 wurde erneut wie oben beschrieben die angereicherte Proteinfraction per SDS-Gel untersucht. Es war anhand des Gels und des Aktivitätsverlauf eindeutig eine Bande (mit Pfeil markiert) der Vinorin-Synthase zuzuordnen (siehe Abbildung 16).



Abbildung 16: SDS-Gel nach Superdex 75

2.8 Proteolytische Spaltung und Bestimmung von Peptidsequenzen

Zur Ermittlung der Aminosäuresequenz der Vinorin-Synthase wurde die in Abbildung 14 gekennzeichnete Bande mit der Endoproteinase LysC verdaut, die Peptide nach der Aminosäure Lysin spaltet. Die Durchführung der proteolytischen Spaltung und die Bestimmung der Aminosäuresequenz erfolgte am Max-Planck Institut in Martinsried. Der Verdau erfolgte direkt im Gel (Cleveland et al. 1977). Die Bande wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die durch den Verdau erhaltenen Proteine wurden eluiert, mittels HPLC getrennt und fraktioniert. Die Sequenzierung einzelner Peptidfraktionen führte zu den folgenden vier Peptidsequenzen (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Ergebnis der Sequenzierung der Proteinbande von Abbildung 16)

Peptidfragment	Aminosäuresequenz (Länge)
24	IEVNEDVPLAVK (12)
36	GETEIVLPNFDLAAR (15)
19	FVFDKEK (7)
38	VQLVVAYIWK (10)

2.9 Homologievergleiche der Peptide

Durch den Vergleich der obigen Peptidfragmente mit bereits bekannten, in Datenbanken gesammelten Proteinsequenzen lassen sich Homologien zu anderen Proteinen/Enzymen feststellen. Die Datenbankrecherche erfolgte in der *SwissProt*-Datenbank unter Verwendung des FASTA-Sequenzanalyse-Programms.

Die Datenbankrecherche ergab, dass keines der vier Peptidfragmente eine Homologie zu einer bereits bekannten Acetyltransferase oder einem anderen

Enzym aufwies. So war es nicht möglich zu ermitteln, wo die Peptidfragmente in der Vinorin-Synthase lokalisiert sein könnten, und es musste ohne die Sicherheit, dass es sich tatsächlich um die Bande der Vinorin-Synthase gehandelt hat, mit den molekularbiologischen Versuchen begonnen werden.

3 Klonierung und heterologe Expression des Vinorin-Synthase-Gens

Nach der Sequenzierung der Vinorin-Synthase und dem Erhalt der vier Peptidfragmente konnte mit den molekularbiologischen Arbeiten begonnen werden. Da der Homologievergleich der Sequenzen mit bekannten Proteinen keinerlei Hinweis auf die Lokalisation der Aminosäurefragmente im Gen der Vinorin-Synthase gab, wurden von allen vier Fragmenten degenerierte forward und reverse Oligonukleotid-Primer synthetisiert, um das erste cDNA-Fragment der Vinorin-Synthase zu erhalten.

Tabelle 13: Sequenzen der degenerierten Oligonukleotid-Primer

Primer	Degenerierte Oligonukleotid Sequenz
19 for	5'-TT(C/T) GT(G/A/T/C) TT(C/T) GA(C/T) AA(A/G) GA(A/G) AA(A/G)-3'
19 rev	5'-(CT)TT (CT)TC (CT)TT (AG)TC (AG)AA (G/A/T/C)AC (AG)AA-3'
24 for	5'-AT(A/T/C) GA(A/G) GT(G/A/T/C) AA(C/T) GA(A/G) GA(C/T) GT(G/A/T/C) CC-3'
24 rev	5'-A(AG)(G/A/T/C) GG(G/A/T/C) AC(A/G) TC(C/T) TC(A/G) TT(G/A/T/C) AC(C/T) TC-3'
36 for	5'-GA(AG) AC(G/A/T/C) GA(A/G) AT(A/C/T) GT(G/A/T/C) (CT)T(G/A/T/C) CC(G/A/T/C) AA(C/T) TT(C/T) G-3'
36 rev	5'-C(A/G)A A(A/G)T T(G/A/T/C)G G(G/A/T/C)A (A/G)(G/A/T/C)A C(A/G/T)A T(C/T)TC(G/A/T/C)G C(C/T)T C-3'
38 for	5'-CA(A/G) (C/T)T(G/A/T/C) GT(G/A/T/C) GT(G/A/T/C) GC(G/A/T/C) TA(C/T) AT(A/C/T) TGG-3'
38 rev	5'-(C/T)TT CCA (A/G/T)AT (A/G)TA (G/A/T/C)GC (G/A/T/C)AC (G/A/T/C)AC (G/A/T/C)A(A/G) (C/T)TG-3'

3.1 Herstellen des ersten Vinorin-Synthase cDNA-Fragments

Um das erste, für die Vinorin-Synthase codierende, cDNA-Fragment zu erhalten, wurde zunächst aus 5 Tage alten *Rauvolfia x Rhazya*-Zellen Gesamt-RNA isoliert. Der erste cDNA-Strang wurde durch reverse Transkription mit einem Oligo-dT-Primer, komplementär zum PolyA-Schwanz der eukaryotischen mRNA-Moleküle, synthetisiert (4.3.1). Mit dieser cDNA als Template für die PCR, wurde mit allen 12 möglichen Primerkombinationen versucht, Vinorin-Synthase cDNA zu amplifizieren (PCR-Bedingungen siehe 4.3.2). Die erhaltenen cDNA Fragmente wurden nach Elution aus dem Gel jeweils in den pGEM-T Easy Klonierungsvektor ligiert, der Ampicillin-Resistenz trägt. Nach der Transformation in *E. coli* TOP 10 Zellen wurden die Transformationsprodukte auf LB-Ampicillin-Platten selektiert. Einzelne gewachsene Kolonien wurden „gepickt“ und das enthaltene Plasmid mit *EcoRI* und *XhoI* verdaut. Die Transformationsprodukte wurden durch Sequenzierung (Sanger et al. 1977) überprüft. Auf diesem Weg war es nicht möglich, cDNA-Fragmente zu erhalten, die die für die Primer codierenden Sequenzen enthielten und einen offenen Leserahmen aufwiesen. Homologievergleiche bekannter Acetyltransferasen zeigten eine konservierte Region der Enzyme, nahe am C-Terminus, mit der in Abbildung 17 gezeigten Sequenz.

SALAT	-WCRMGLYEIDFGWGKPIWVTVDPN-	445
DAT	SWCRFPFYDVIDFGWGKPIWVCLFQP----Y	407
DBAT	-RRRLGFDEVDFGWGHADNVSLVQHGLKDV	403
BEAT	-WCRFPLYEVDFGWGI PSLVDTTAVP----	404
TAT	-WSRLGFDEVDFGWGNVAVSEVSPVQQ-QSA	402
PCHBT	SWGRIPIYQAMDFGWGSPFTFFFGIS----N	419
TBT	-WRNLGFYEADFGWGNVAVNVS PMQQQREHE	398

Abbildung 17: Sequenz-Alignment bekannter Acetyltransferasen

SALAT: Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase aus *Papaver somiferum* (Grothe et al. 2001)

DAT: Deacetylvindolin-4-O-Acetyltransferase aus *Catharanthus roseus* (St-Pierre et al. 1998)

BEAT: Benzylalcohol-Acetyltransferase aus *Clarkia breweri* (Dudareva et al. 1998)

TAT: Taxadienol-O-Acetyltransferase aus *Taxus cuspidat* (Walker et al. 2000)

PCHBT: Anthranilate-N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase aus *Dianthus caryophyllus* (Yang et al. 1997)

TBT: Taxan-2alpha-O benzoyltransferase aus *Taxus* (Walker und Croteau 2000)

Ausgangspunkt war die Hypothese, dass Enzyme mit ähnlichen Funktionen auch ähnliche Motive in ihren Primärstrukturen aufweisen. So wurde vermutet, dass die Vinorin-Synthase zur gleichen Familie der Acetyltransferasen gehört und deshalb die gleichen konservierten Regionen besitzt.

Basierend auf dem bei allen Acetyltransferasen vorhandenen DFGWG-Motiv wurde ein degenerierter reverse-Primer synthetisiert. Mit diesem reverse-Primer in Kombination mit dem degenerierten forward-Primer 19 (basierend auf einer der vier Proteinsequenzen der Vinorin-Synthase, (siehe Tabelle 13) wurde versucht, durch PCR ein erstes cDNA-Fragment der Vinorin-Synthase zu erhalten.

Mit diesen zwei Primern (siehe Tabelle 14) gelang es, ein cDNA-Fragment mit einer Größe von ca. 400 Basenpaaren zu amplifizieren (siehe Abbildung 18).

Tabelle 14: Primer für die PCR zur Synthese des ersten cDNA-Fragments der Vinorin-Synthase

Primer	Sequenz
19 for	5`-TT(C/T) GT(G/A/T/C) TT(C/T) GA(C/T) AA(A/G) GA(A/G) AA(A/G)-3`
DFGWG rev	5`-(A/C/G/T)GG GT(G/A/T) (A/G/C/T)GG (C/T/)TT (A/G/C/T)CC CCA (A/G/C/T)CC (G/A)AA (A/G)TC-3`

Die Bande wurde aus dem Gel eluiert, wie in Kapitel 3.1 beschrieben bearbeitet und durch Sequenzierung überprüft.

Die Sequenzierung ergab ein Fragment von 444 Basenpaaren und einem offenen Leserahmen. Beide eingesetzten Primer ließen sich zusätzlich zum Aminosäurefragment 38 (siehe Tabelle 12) wiederfinden. Das 5`- und 3`-Ende des Gens waren noch nicht vorhanden. Die Sequenz des 444 Basenpaar langen Fragments und die Homologie zu anderen Acetyltransferasen ist in Abbildung 19 verdeutlicht (Pfeile über der Sequenz markieren das Fragment). Der Homologievergleich des Fragments in der Datenbank ergab erstmals eine Homologie von bis zu 32 % zu oben genannten Acetyltransferasen. Daher konnte vermutet werden, dass diese erste cDNA ein Teil des Vinorin-Synthase-Gens repräsentierte.

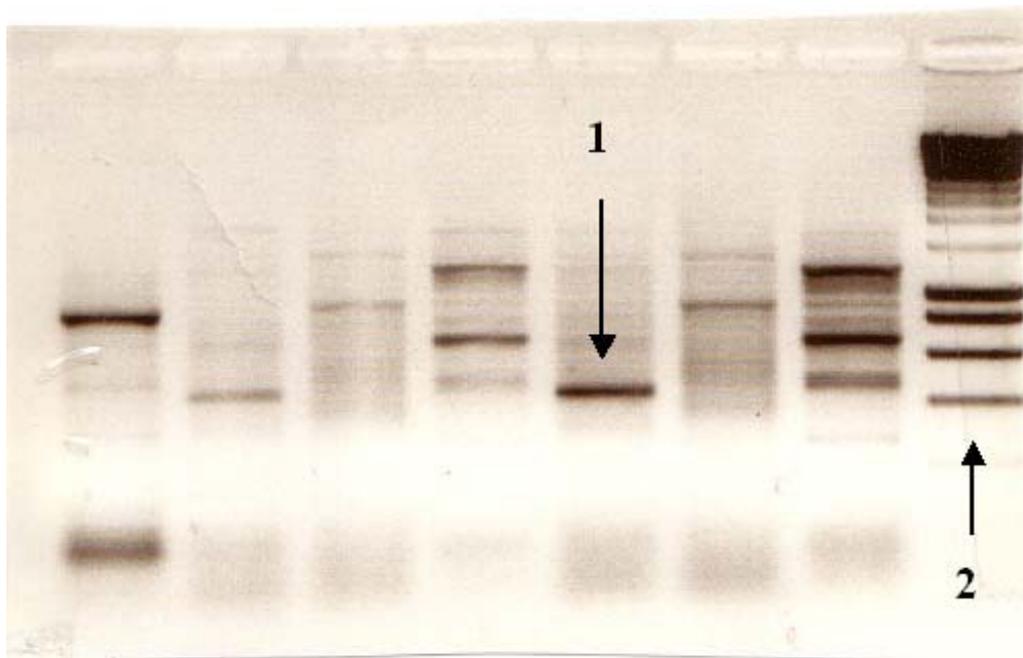


Abbildung 18: Polyacrylamid-Gel nach der PCR zur Synthese eines ersten cDNA-Fragments der Vinorin-Synthase.

- 1 erstes cDNA-Fragment der Vinorin-Synthase
- 2 Markerbande mit einer Größe von 400 Basenpaaren

3.2 Amplifizieren der Vinorin-Synthase cDNA-Enden

Um das 5'-und 3'-Ende des putativen Vinorin-Synthase-Gens zu erhalten, wurde die Methode der RACE-PCR angewandt. Diese Technik erlaubt es, mit nur jeweils einem genspezifischen forward- und reverse-Primer die fehlenden Enden eines Gens zu amplifizieren. Der zweite für die PCR benötigte Primer ist komplementär zur Adapter-DNA-Sequenz, die an beide Enden der cDNA ligiert wurde. Die adapter-ligierte cDNA-Bibliothek wurde aus mRNA einer 5 Tage alten *Rauvolfia x Rhayza*-Zellsuspensionskultur, mit dem GeneRacer Kit nach den Anleitungen des Herstellers gewonnen.

Tabelle 15 zeigt die genspezifischen Primer, die für die RACE-PCR verwendet wurden (Bedingungen siehe 4.3.3).

Tabelle 15: Primer zur Synthese des 5'-und 3'- Endes

5'-Race	5'-C CAT ATT TTG CCC GGG TCA CGT CAA TG-3'
3'-Race	5`GT CCG TTG AGA ACC AGC CTA GGA AAA AC-3`

Die erwartete Größe des fehlenden 5'-Endes betrug 850 und die des 3'-Endes 300 Basenpaare.

Zwei Banden entsprechender Größe (siehe Abbildung 19) wurden aus dem Gel eluiert, in den pGEM-T Easy Vektor ligiert und in TOP 10 Zellen transformiert. Die Sequenzierung der Transformationsprodukte ergab die Aminosäuresequenz beider Enden des putativen Vinorin-Synthase-Gens.

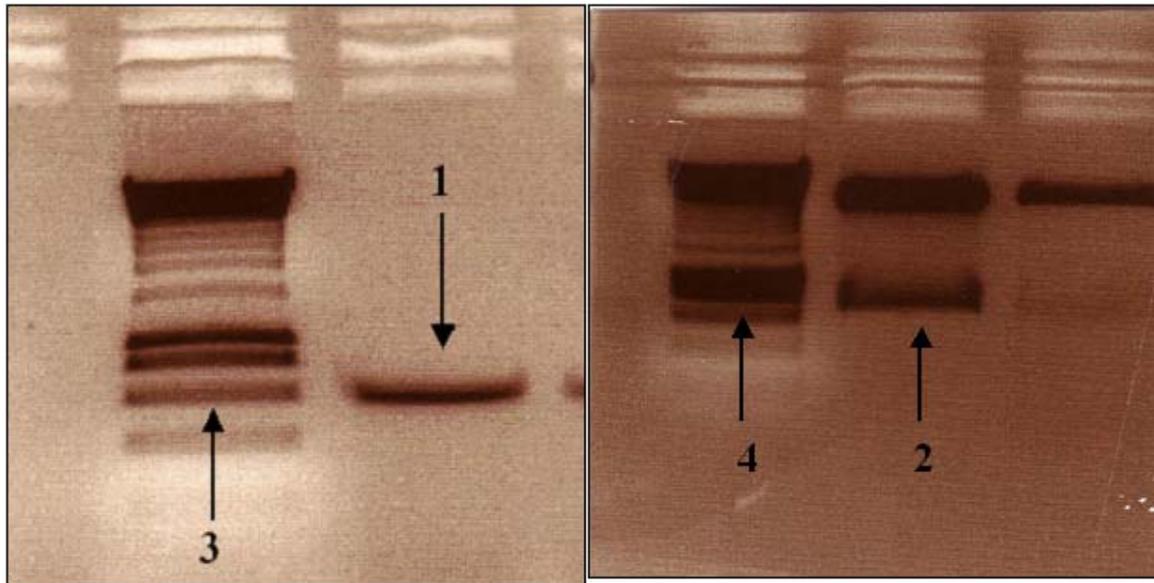


Abbildung 19: Gele der 5'- und 3'-Race-PCR

- 1 PCR-Fragment der 3'-RACE
- 2 PCR-Fragment der 5'-RACE
- 3 Markerbande einer Größe von 400 Basenpaaren
- 4 Markerbande einer Größe von 800 Basenpaaren

3.3 Synthese des Vinorin-Synthase-Vollängenklons

Zur Synthese der Vollängen-cDNA wurden basierend auf der Sequenz des 5'- und 3'-Endes zwei Primer entwickelt (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Primer zur Synthese des Vollängenklons der Vinorin-Synthase

forward	5'-TTA ACG GTA GTA ACG CAT ATG GCA CCC CAG ATG-3'
reverse	5'-GG GTA CGA GCT CTC ACT TGC TCA AAA TC-3'

Diese Primer generierten *Nde* I- und *Sac* I-Schnittstellen an beide Enden des Gens passend für die Ligation in den Expressionsvektor pQE2.

Die PCR wurde unter den in 4.3.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Eine Bande der entsprechenden Größe von etwa 1300 Basenpaaren wurde aus dem Gel eluiert (siehe Abbildung 20). Nach der Elution wurden sowohl der Vollängenklon als auch der Expressionsvektor pQE2 mit den

Restriktionsenzymen für 3 h bei 37 °C verdaut, bevor der Vollängenklon der Vinorin-Synthase in den Vektor einligiert wurde. Das Ligationprodukt wurde in TOP 10 *E. coli*-Zellen transformiert und zur Kontrolle sequenziert. Die Sequenzierung ergab für die Vinorin-Synthase eine 1263 Basenpaare lange Sequenz mit offenem Leserahmen und einer Größe von 46 kDa (siehe Abbildung 21). Der errechnete isoelektrische Punkt liegt bei pH 7.8. Wie durch N-Terminales Sequenzieren bewiesen, dient das erste Methionin als Startcodon (Obitz 1995). In der Sequenz lassen sich alle vier Aminosäurefragmente wiederfinden (siehe Tabelle 12), die durch die Sequenzierung nach der Proteinreinigung erhalten wurden. Auch beide Primer zur Synthese des ersten cDNA-Fragments (siehe Tabelle 14) sind vorhanden.

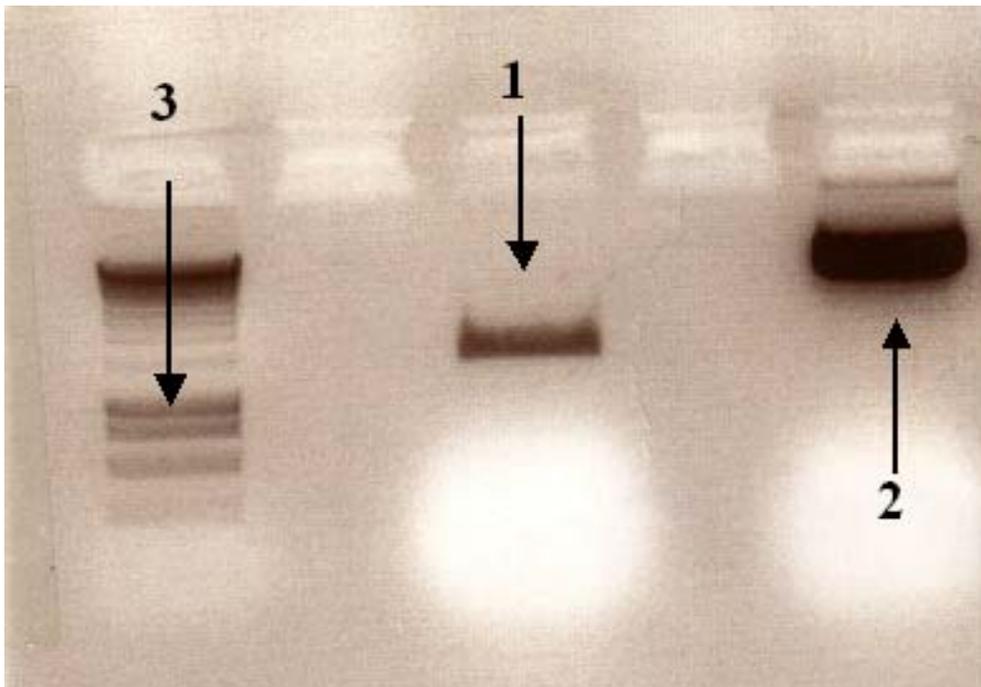


Abbildung 20: Gel des Vinorin-Synthase-Vollängenklons

- 1 Gelbande des Vollängenklons
- 2 Gelbande des pQE2-Expressionsvektors
- 3 Markerbande mit einer Größe von 1000 Basenpaaren

Abbildung 21 zeigt das Vinorin-Synthase-Gen :

1	ATG GCA CCC CAG ATG GAG AAA GTA TCG GAG GAG CTG ATT CTA CCA TCA TCT CCA ACA CCC CAA AGC TTG AAA	72
1	<u>M</u> A P Q M E K V S E E L I L P S S P T P Q S L K	24
73	TGC TAT AAA ATT TCC CAC CTA GAT CAA CTG TTA TTA ACG TGT CAC ATC CCT TTT ATT CTC TTC TAT CCA AAT	144
25	C Y K I S H L D Q L L L T C H I P F I L F Y P N	48
145	CCG TTA GAC TCA AAC CTC GAT CCT GCC CAG ACA TCT CAG CAC CTG AAA CAA TCT TTG TCC AAA GTG TTA ACT	216
49	P L D S N L D P A Q T S Q H L K Q S L S K V L T	72
217	CAC TTT TAC CCT CTA GCT GGA AGG ATC AAC GTA AAT TCT TCC GTA GAC TGT AAT GAT TCT GGA GTT CCT TTT	288
73	H F Y P L A G R I N V <u>N S S</u> V D C N D S G V P F	96
289	GTC GAA GCT CGG GTT CAA GCT CAA CTC TCA CAG GCA ATT CAG AAC GTC GTC GAG TTA GAA GAA CTC GAT CAA	360
97	V E A R V Q A Q L S Q A I Q N V V E L E K L D Q	120
361	TaC CTT CCG TCC GCA GCT TAT CCC GGC GGG AAA ATT GAG GTG AAC GAG GAT GTT CCC CTG GCT GTC AAA ATC	432
121	Y L P S A A Y P G G K <u>I E V N E D V P L A V K</u> I	144
433	AGT TTC TTT GAG TGT GGA GGC ACG GCC ATT GGT GTC AAC TTA TCG CAT AAG ATA GCT GAT GTA TTG TCC CTG	504
145	S F F E C G G T A I G V H L S H K I A D V L S L	168
505	GCC ACC TTC CTC AAC GCA TGG ACT GCC ACA TGC CGT GGG GAA ACG GAG ATT GTG CTA CCT AAT TTT GAC TTG	576
169	A T F L N A W T A T C R <u>G E T E I V L P N F D L</u>	192
577	GCA GCA CGT CAT TTT CCG CCC GCG GAC AAC ACC CCG TCT CCT GAA TTG GTA CCG GAT GAA AAC GTT GTG ATG	648
193	<u>A A R</u> H F P P V D N T P S P E L V P D E N V V M	216
649	AAA AGA TTT GTG TTT GAT AAA GAG AAA ATA GGA GCC CTC AGA GCA CAA GCT TCC TCG GCC TCA GAG GAG AAG	720
217	K R <u>F V F D K E K</u> I G A L R A Q A S S A S E E K	240
721	AAT TTC AGT CGG GTA CAG CTT GTT GTT GCT TAT ATA TGG AAG CAC GTC ATT GAC GTG ACC CGG GCA AAA TAT	792
241	<u>N F S</u> R <u>V Q L V V A Y I W K</u> H V I D V T R A K Y	264
793	GGT GCT AAA AAC AAG TTT GTG GTA GTT CAA GCA GTG AAC CTG AGG TCA AGA ATG AAT CCG CCC CTT CCT CAC	864
265	G A K N K F V V V Q A V N L R S R M N P P L P H	288

865	TAT	GCT	ATG	GGG	AAC	ATC	GCC	ACA	CTA	TTA	TTC	GCG	GCT	GTA	GAT	GCA	GAG	TGG	GAC	AAA	GAT	TTT	CCG	GAT	936
289	Y	A	M	G	N	I	A	T	L	L	F	A	A	V	D	A	E	W	D	K	D	F	P	D	312
937	CTC	ATC	GGT	CCG	TTG	AGA	ACC	AGC	CTA	GAA	AAA	ACT	GAG	GAC	GAC	CAT	AAC	CAC	GAA	TTA	CTA	AAG	GGA	ATG	1008
313	L	I	G	P	L	R	T	S	L	E	K	T	E	D	D	H	N	H	E	L	L	K	G	M	336
1009	ACT	TGT	TTG	TAT	GAA	CTG	GAA	CCT	CAA	GAA	CTT	TTG	TCT	TTC	ACC	AGT	TGG	TGT	AGG	CTT	GGC	TTT	TAT	GAC	1080
337	T	C	L	Y	X	L	E	P	Q	E	L	L	S	F	T	S	W	C	R	L	G	F	Y	<u>D</u>	360
1081	TTG	GAT	TTC	GGC	TGG	GGG	AAG	CCT	CTT	TCA	GcG	TGC	aCA	ACA	aCT	TTT	CCC	AAG	AGG	AAC	GCG	GCG	CTT	TTG	1152
361	<u>L</u>	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>G</u>	<u>W</u>	<u>G</u>	K	P	L	S	A	C	T	T	T	F	P	K	R	N	A	A	L	L	384
1153	ATG	GAT	aCA	AgA	TTC	GGA	GAT	GGA	GTG	GAA	GCA	TGG	CTC	CCA	ATG	GCA	GAA	GAT	GAA	ATG	GCG	ATG	CTT	CCT	1224
385	M	D	T	R	S	G	D	G	V	E	A	W	L	P	M	A	E	D	E	M	A	M	L	P	408
1225	GTT	GAA	TTG	CTG	TCA	CTT	GTA	GAC	AGC	GAT	TTT	AGC	AAG	TGA											1263
409	V	E	L	L	S	L	V	D	S	D	F	S	K	*											421

Abbildung 21: Nukleotid- und davon abgeleitete Aminosäuresequenz der Vinorin-Synthase

Unterstrichene Buchstaben symbolisieren die Proteinformen nach der Proteinreinigung; kursive Buchstaben symbolisieren die Primer zur Synthese des ersten cDNA-Fragments der Vinorin-Synthase, das Startcodon ist das erste Methionin, das Stopcodon ist mit einem Stern gekennzeichnet. Kursive und gleichzeitig unterstrichene Buchstaben symbolisieren mögliche N-Glykosylierungsstellen.

3.4 Heterologe Expression und Aufreinigung der Vinorin-Synthase in *E. coli*

Zur Überprüfung ob die vorliegende cDNA-Sequenz tatsächlich für die Vinorin-Synthase codiert, wurde diese exprimiert. Dazu wurde zuerst das Vinorin-Synthase pQE2-Plasmid mit NucleoSpin Plasmid-Säulchen aus den TOP 10 Zellen isoliert und in M15 *E. coli*-Zellen transformiert (codieren für Kanamycin-Resistenz). M15-Zellen enthalten das Hilfsplasmid pREP4, welches durch IPTG-Induktion eine höhere Expressionsrate der Vinorin-Synthase erlaubt. Nach der Transformation wurden die Transformationsprodukte auf LB-Kanamycin-Ampicillin-haltige Platten selektiert. Einzelne gewachsene Kolonien wurden „gepickt“.

Die gepickten Kolonien wurden über Nacht bei 37 °C in flüssigem LB-Kan-Amp-Medium inkubiert (Kanamycin: 25 mg/l; Ampicillin: 50 mg/l). Von dieser Kultur wurden 10 ml in 2 Liter LB-Kan-Amp Medium gegeben, mit 0.5 mM IPTG versetzt und 24 h bei RT kultiviert. Die Zellen wurden wie in 1.2 und 1.3 beschrieben aufgeschlossen. Im Anschluss erfolgte die Aufreinigung an einer Ni-NTA-Säule (Bedingungen siehe 1.9.5). Die Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 0.5 ml/min auf die Säule, gefüllt mit 2 ml Säulenmaterial, aufgegeben. Die Säule wurde zuvor mit Puffer a (1.9.5) äquilibriert. Nach einem Waschschrift wurden die gebundenen Proteine mit einem linearen Imidazolgradienten von 20 - 250 mM über 20 Säulenvolumen eluiert. Es wurden Fraktionen mit einer Größe von 1.5 ml aufgefangen. Die Proteinkonzentration der eluierten Fraktionen wurde ermittelt. Es wurden etwa 2 mg Enzym erhalten, was einer Ausbeute von 1 mg/l entspricht. Von jeder Proteinfraktion wurden 20 µl mit 20 µl Proben-Puffer versetzt und SDS-gelelektrophoretisch untersucht (siehe Abbildung 24). Um zu überprüfen, ob es sich bei dem exprimierten Enzym tatsächlich um die Vinorin-Synthase handelt, wurden mit je 15 µl der gesammelten Fraktionen Standard-Aktivitätstests durchgeführt (siehe 2). Die Aktivität des Enzyms wurde mittels HPLC untersucht. Die Ergebnisse zeigten eindeutig, dass es erstmals gelungen war die Vinorin-Synthase, versehen mit einem 6fachen Histidin-Rest, aktiv heterolog in *E. coli* zu exprimieren (siehe Abbildung 23).

Die Enzymtests wurden auch in Abwesenheit des Co-Substrates wiederholt. Ohne Acetyl-CoA ist keine Enzymaktivität nachweisbar. Durch die Aufreinigung an der Ni-NTA-Säule gelang es, hochreines Enzym im mg-Maßstab zu produzieren (1 mg/ml) (siehe Abbildung 22).

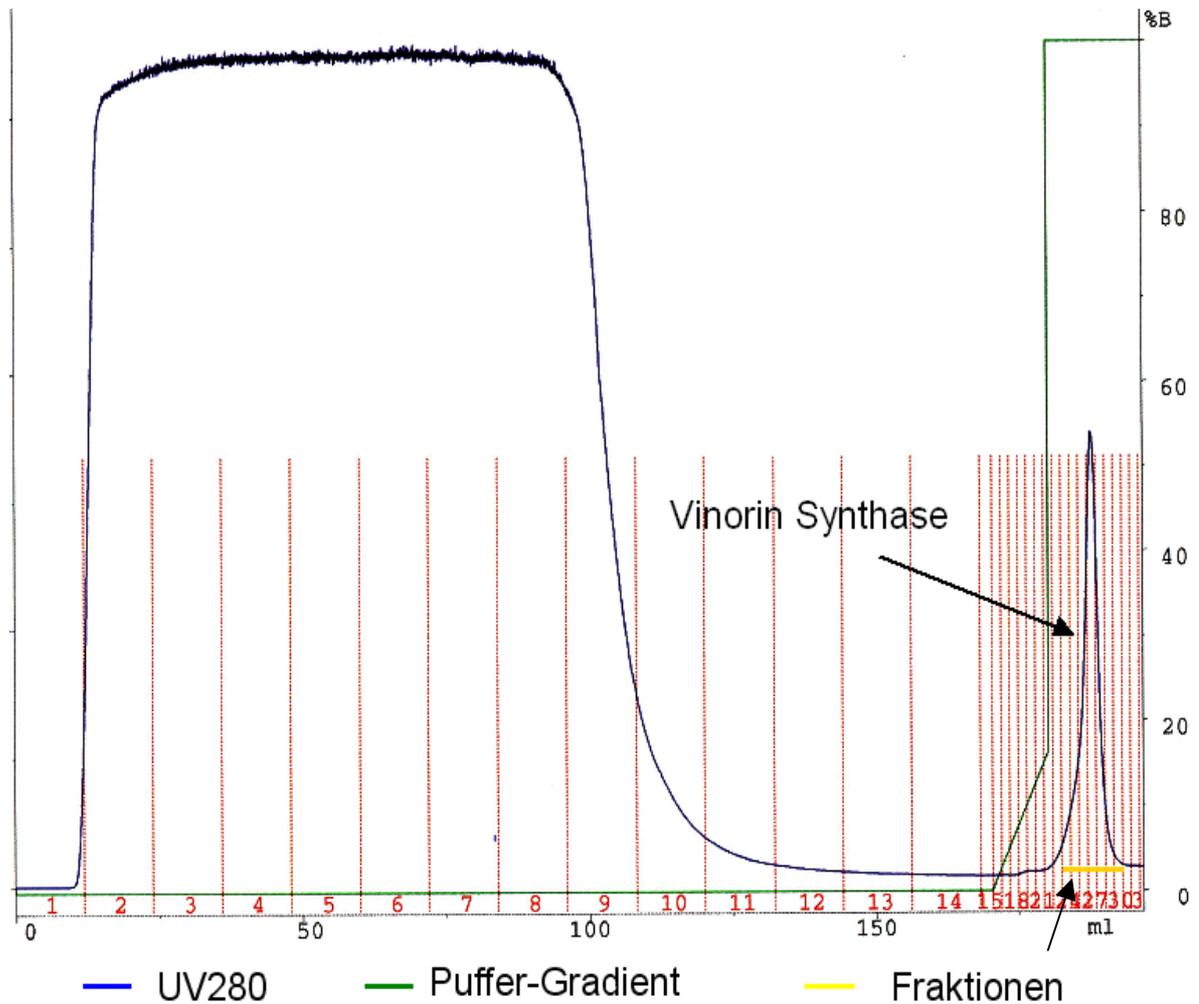


Abbildung 22: Elutionsprofil der heterolog exprimierten Vinorin-Synthase an Ni-NTA

UV280: UV-Absorptionsprofil bei 280 nm (mAU), Puffer-Gradient: Konzentration an Elutionspuffer (20 - 250 mM Imidazol), Fraktionen: gesammelte Fraktionen der Vinorin-Synthase (Fraktionsgröße 1.5 ml)

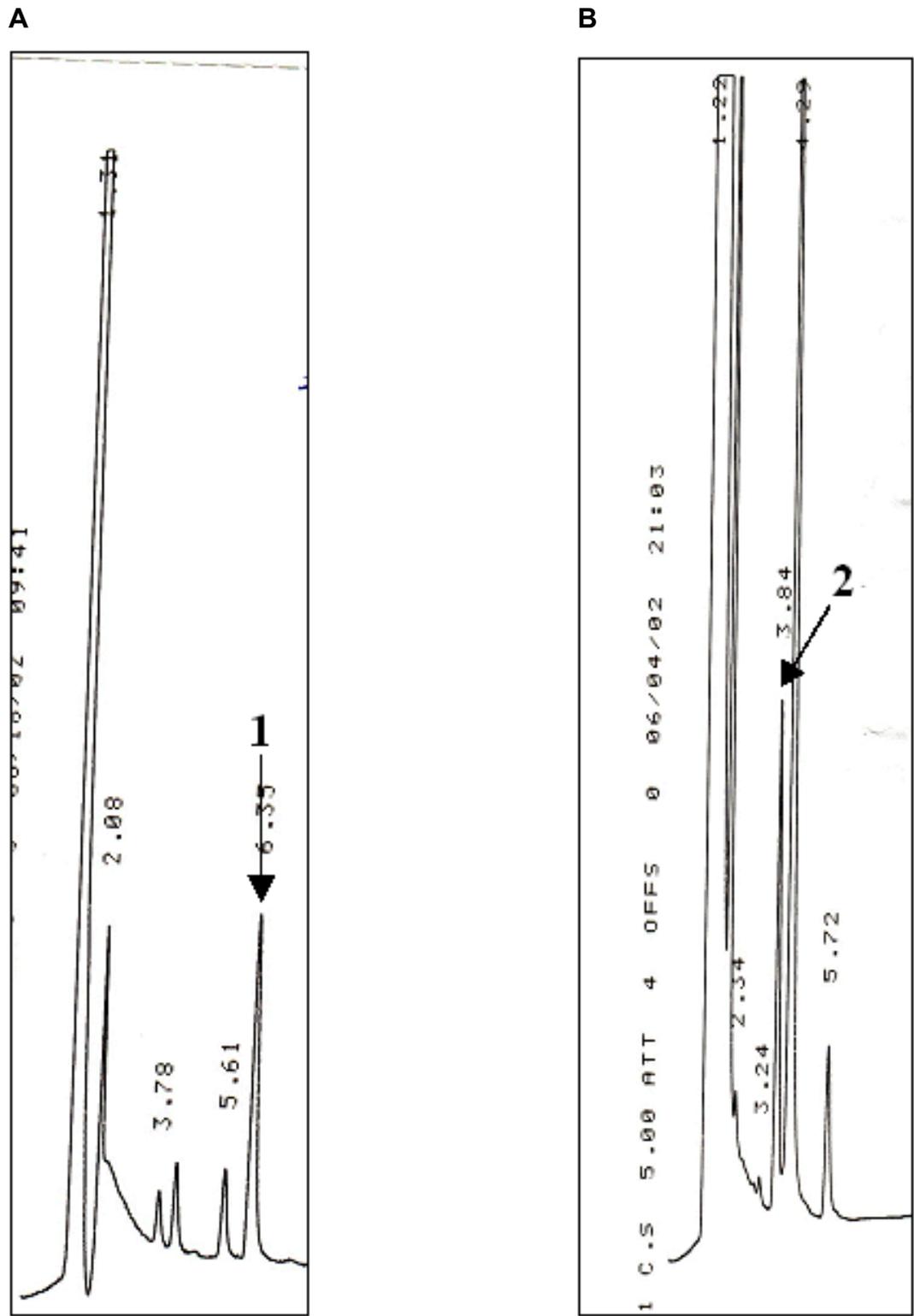


Abbildung 23: HPLC-analytische Untersuchung der Aktivität mit heterolog exprimierter Vinorin-Synthase (A) und ohne Enzym (B)

- 1 Methoxyvinorin
- 2 Gardneral

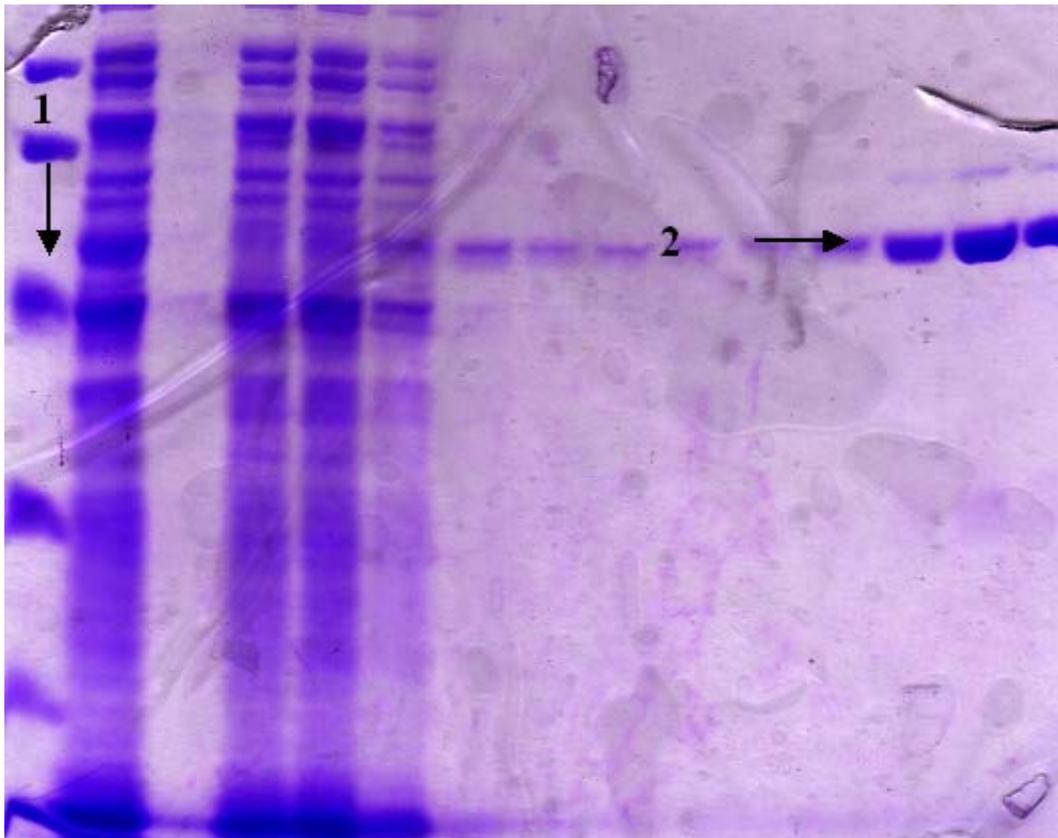


Abbildung 24: Coomassie-blau gefärbtes SDS-Gel der Vinorin Synthase mit His-tag nach der Reinigung an Ni-NTA

- 1 Proteinstandard mit einer Größe von 45 kDa
- 2 Fraktionen der 6 x His-tag Vinorin-Synthase

Die Identität des Produktes 11-Methoxyvinorin wurde zusätzlich durch Massenspektrometrie bewiesen (siehe Abbildung 25). Spektrum A zeigt das Enzymprodukt nach der Inkubation von Gardneral mit der heterolog exprimierten Vinorin-Synthase. Spektrum B zeigt ein Massenspektrum eines Vinorin-Standards zum Vergleich. Der Massenpeak des Enzymproduktes Methoxyvinorin m/z 364 entspricht dem des Vinorins m/z 334; die Differenz von m/z 30 resultiert aus der zusätzlichen Methoxygruppe an Position 11. Die weiteren Fragmentationen: m/z 198 (168), 212 (182) m/z und 305 (275) m/z zeigen diese Differenz und beweisen die Richtigkeit der Identifizierung des Enzymproduktes.

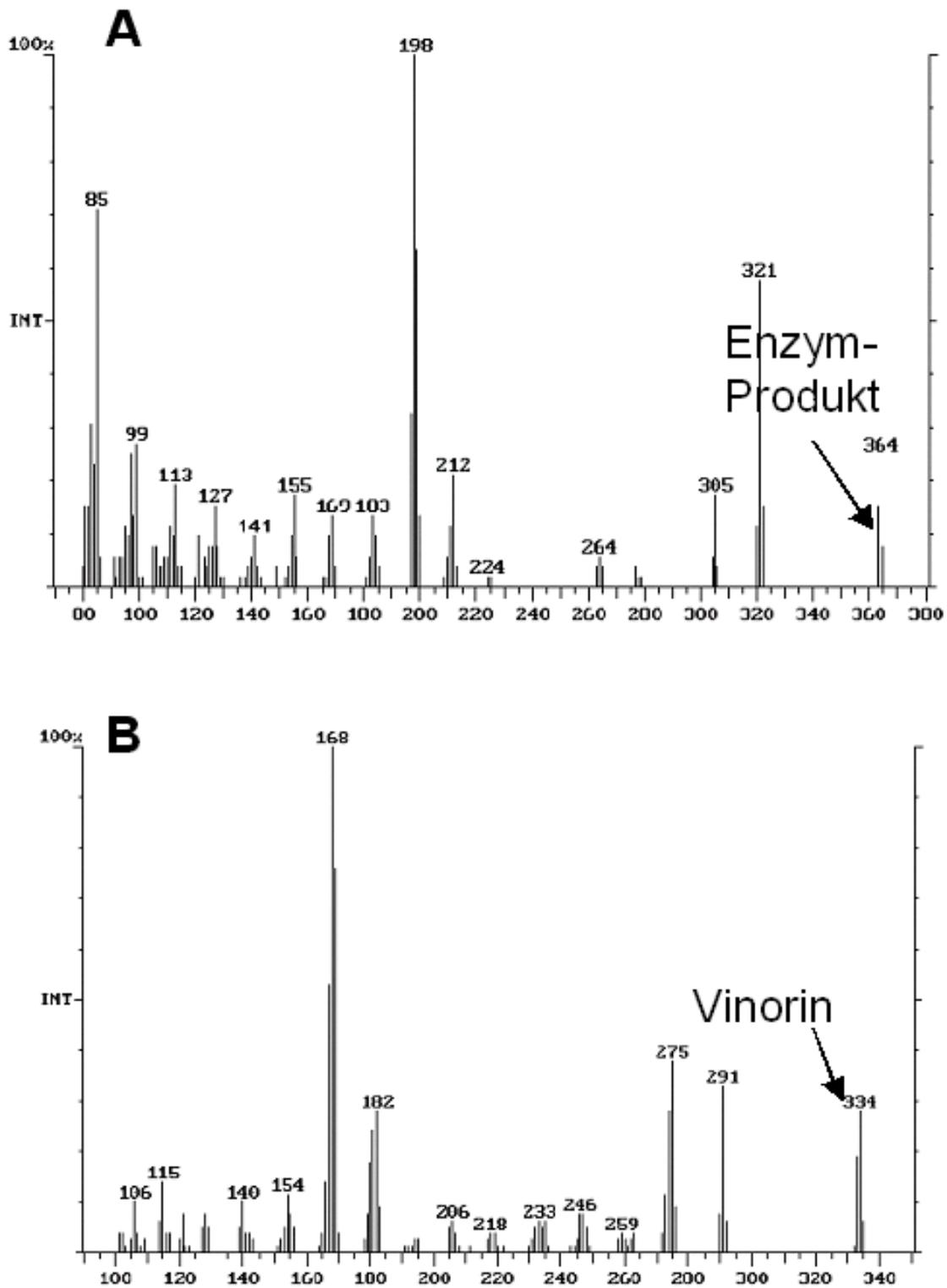


Abbildung 25: Massenspektren

- A** von 11-Methoxyvinorin erhalten nach der Inkubation von Gardneral (m/z 364) mit der heterolog exprimierten Vinorin-Synthase
- B** Massenspektrum eines Vinorin-Standards (m/z 334)

Die in 3.4 beschriebene heterologe Expressierung der Vinorin-Synthase wurde, wenn große Enzymmengen benötigt wurden, mit bis zu 12 l LB-Kan-Amp-Medium durchgeführt. Der Wachstums- und Ernteprozess war identisch mit dem in kleinerem Maßstab (3.4). Bei der Aufreinigung wurden 8 ml Ni-NTA Säulenmaterial verwendet. Bei diesen großen Ansätzen wurden bis zu 42 mg Protein erhalten. Dies entsprach einer Ausbeute von 3.5 mg/l. Solche großen Mengen Enzym wurden zur Kristallisation der Vinorin-Synthase benötigt (siehe Kapitel 7).

4 Enzymeigenschaften

Durch die Expression der Vinorin-Synthase im pQE2-Vektor der für einen 6 fachen N-terminalen His-tag codiert, war es gelungen, das Enzym in hochreiner Form zu erhalten. Dies war die erste Voraussetzung, um das Enzym charakterisieren zu können. Eine weitere Voraussetzung ist die zuverlässige Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Enzymaktivitäten. Dies war möglich mit dem in Kapitel 2 beschriebenen Enzymaktivitätstest, der erlaubte, Substratkonzentrationen, pH-Werte oder Temperatur zu variieren und so die Vinorin-Synthase ausführlich zu charakterisieren.

4.1 Bestimmung von K_M -Werten

Der K_M -Wert gibt Auskunft über die Affinität eines Enzyms zum jeweiligen Substrat und ist somit eine sehr wichtige Größe zur Charakterisierung von Enzymen. Im Folgenden wurden die K_M -Werte bzw. V_{max} -Werte von Gardneral und dem Co-Substrat Acetyl-CoA bestimmt. Diese Werte wurden zunächst mit der Vinorin-Synthase, die einen 6 fachen His-tag trug, später mit Enzym ohne His-tag, bestimmt.

4.1.1 K_M -Wert von Gardneral

Gardneral ist nicht das natürliche Substrat der Vinorin-Synthase, sondern dessen 11-Methoxyderivat. Der K_M -Wert des natürlichen Substrats 16-epi-Vellosimin wurde bereits mit $19.4 \mu\text{M}$ bestimmt, V_{max} betrug 5 pkat . Der K_M -Wert von Acetyl-CoA betrug $64 \mu\text{M}$ und V_{max} betrug 4.4 pkat (Pfitzner et al. 1986).

Zur Bestimmung des K_M -Wertes von Gardneral wurde der Standard-Enzymaktivitätstest (siehe Kapitel 2), mit Gardneral-Konzentrationen von $0.06 - 4.9 \text{ nmol}$ und einer konstanten Acetyl-CoA-Konzentration von 72 nmol , in Anwesenheit von je $0.08 \mu\text{g}$ Vinorin-Synthase, verwendet.

Der K_M -Wert nach Michaelis-Menten wurde bestimmt mit $20 \mu\text{M}$, V_{max} betrug 1 pkat . Der K_M -Wert nach Lineweaver-Burk wurde bestimmt bei $41,2 \mu\text{M}$, V_{max} wurde bei 1.71 pkat ermittelt (siehe Abbildung 26 und Abbildung 27). Die K_M -Werte stimmen nicht überein.

Die spezifische Aktivität einer Standardinkubation betrug 13.35 nkat/mg .

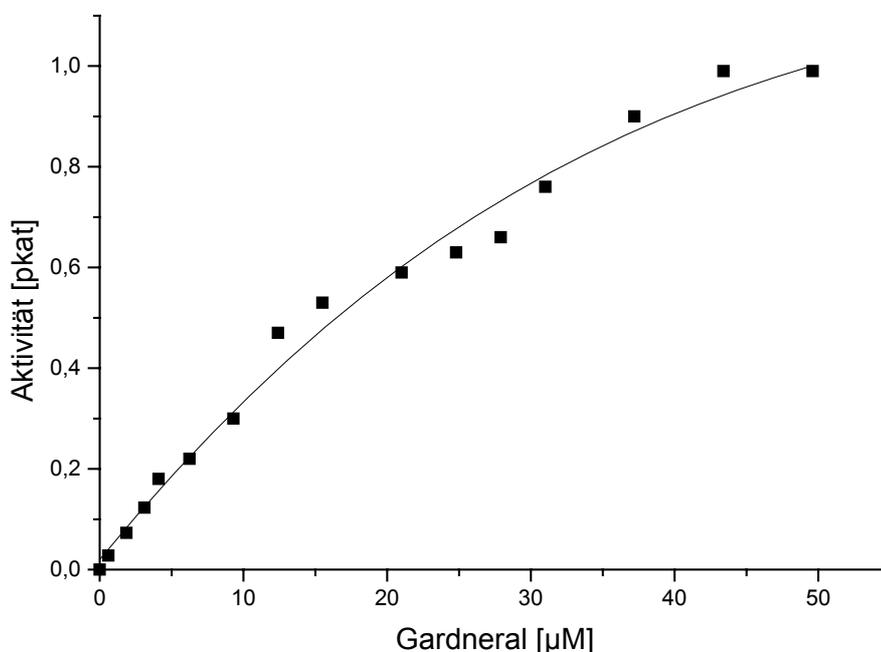


Abbildung 26: Abhängigkeit der Vinorin-Synthase-(+His)-Aktivität in Bezug auf die Gardneral Konzentration; Michaelis-Menten-Kinetik; K_M -Wert 20 μM , V_{max} 1 pkat

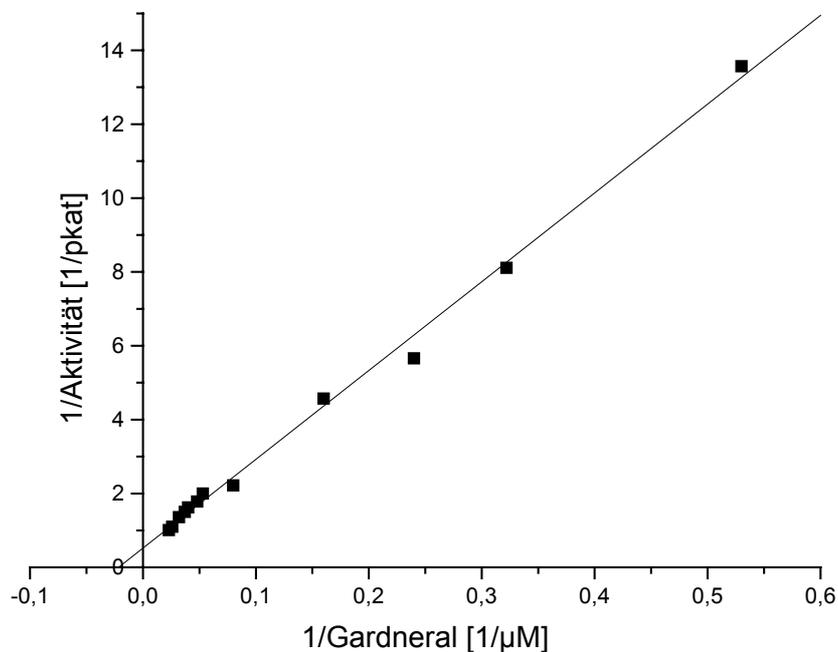


Abbildung 27: Abhängigkeit der Vinorin-Synthase-(+His)-Aktivität in Bezug auf die Gardneral Konzentration; Lineweaver-Burk-Diagramm; K_M -Wert 41,2 μM , V_{max} 1.71 pkat

Um feststellen zu können, inwieweit der 6fache Histidin-Rest die Affinität des Enzyms zum Substrat beeinflusst, wurde der His-tag abgespalten (siehe 4.4.5).

Zu 50 μg Protein wurden 5 μl Cysteamin-HCl (2 mM) und 2.5 μl DAPase (1 U/ml) gegeben und 30 min bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Anschließend wurde zur Lösung 50 μl Ni-NTA Agarose Material (Qiagen) gegeben und 10 min bei 4 $^{\circ}\text{C}$ geschüttelt. Nach Zentrifugation (10 s) bei 14000 x g wurde der Überstand abpipettiert. Die Protein-Lösung wurde gegen 10 mM Tris-HCl Puffer (pH 7.8 mit 10 mM MSH) dialysiert. Anschließend wurden K_M - und V_{max} -Wert mit Gardneral-Konzentrationen von 0.07 - 5.77 nmol und einer konstanten Acetyl-CoA-Konzentration von 72 nmol, in Anwesenheit von je 0.5 μg Vinorin-Synthase, bestimmt. Die spezifische Aktivität der Vinorin-Synthase war 1.4 nkat/mg. Der K_M -Wert nach Michaelis-Menten wurde bestimmt mit 7.5 μM ,

V_{\max} betrug 0.7 pkat. Der K_M -Wert nach Lineweaver-Burk wurde bestimmt bei 27.52 μM , V_{\max} wurde bei 1.21 pkat ermittelt Die K_M -Werte stimmen nicht überein. (siehe Abbildung 28 und Abbildung 29).

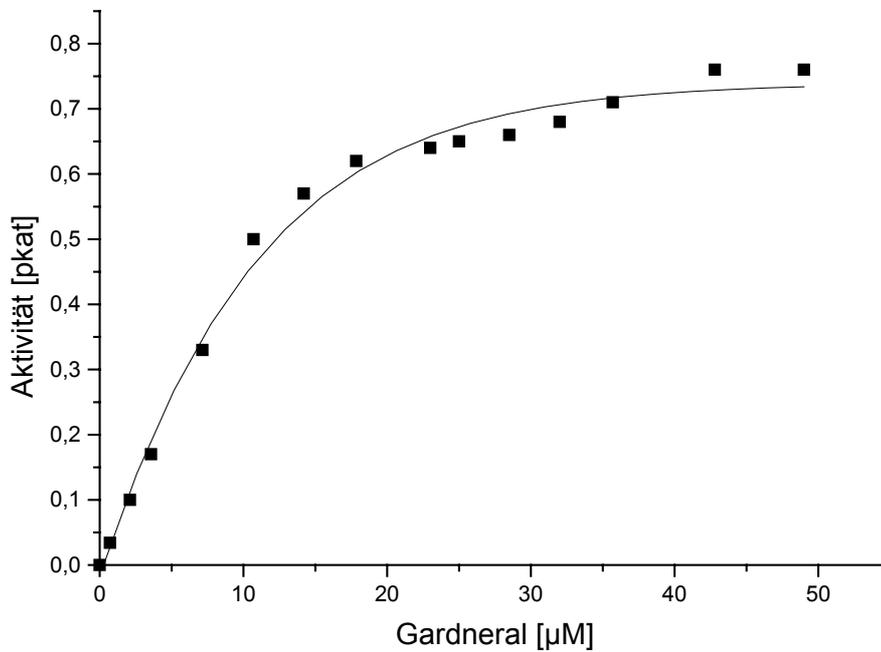


Abbildung 28: Abhängigkeit der Vinorin-Synthase(-His)-Aktivität in Bezug auf die Gardneral-Konzentration; Michaelis-Menten-Kinetik, K_M -Wert 7.5 μM , V_{\max} -Wert 0.7 pkat

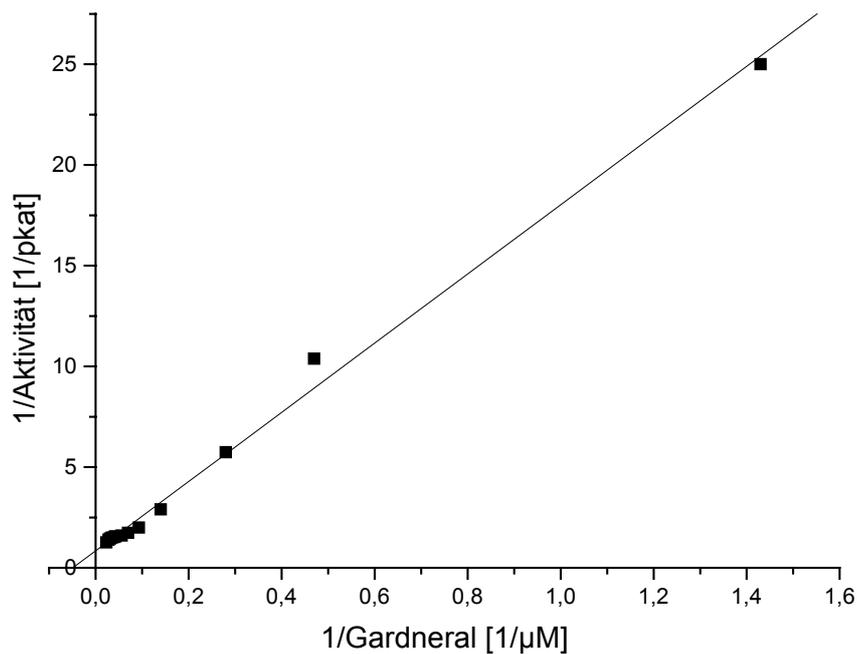


Abbildung 29: Abhängigkeit der Vinorin-Synthase (-His) Aktivität in Bezug auf die Gardneral-Konzentration; Lineweaver-Burk-Diagramm; K_M -Wert 27.52 μM , V_{max} -Wert 1.21 pkat

Alle folgenden Enzymcharakterisierungen wurden mit dem natürlichen Enzym (ohne His-tag) bestimmt.

4.1.2 K_M -Wert des Co-Substrates Acetyl-CoA

Für die Bestimmung des K_M -Wertes von Acetyl-CoA wurden Inkubationen mit Acetyl-CoA-Konzentrationen von 0.14 - 72.92 nmol und einer konstanten Gardneral-Konzentration von 3.57 nmol, in Anwesenheit von je 0.5 μg Vinorin-Synthase, durchgeführt.

Der K_M - Wert wurde mit 60.5 μM bestimmt und V_{max} betrug 0.6 pkat (siehe Abbildung 30 und Abbildung 31).

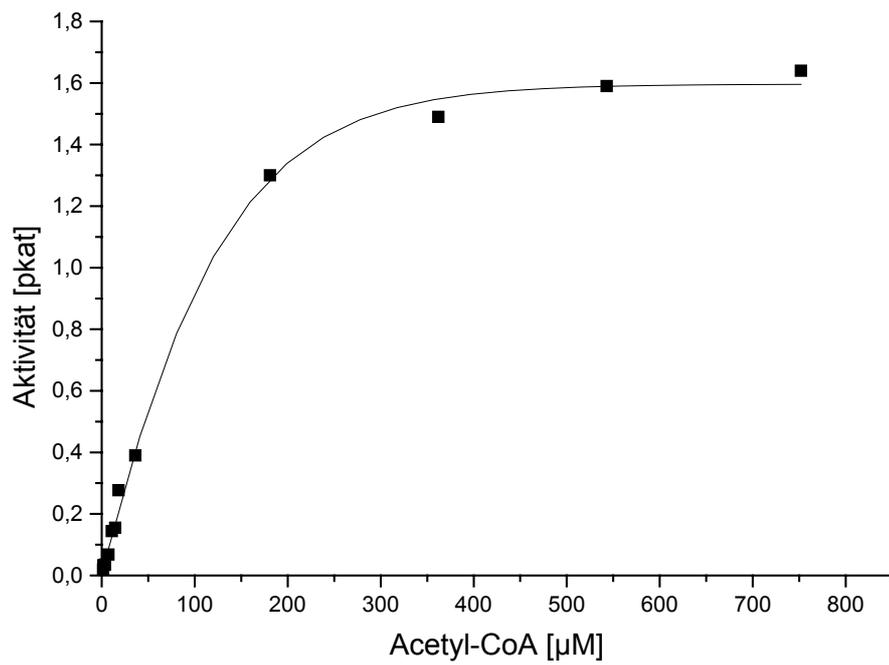


Abbildung 30: Abhängigkeit der Vinorin-Synthase(-His)-Aktivität in Bezug auf die Acetyl-CoA-Konzentration; Michelis-Menten-Kinetik

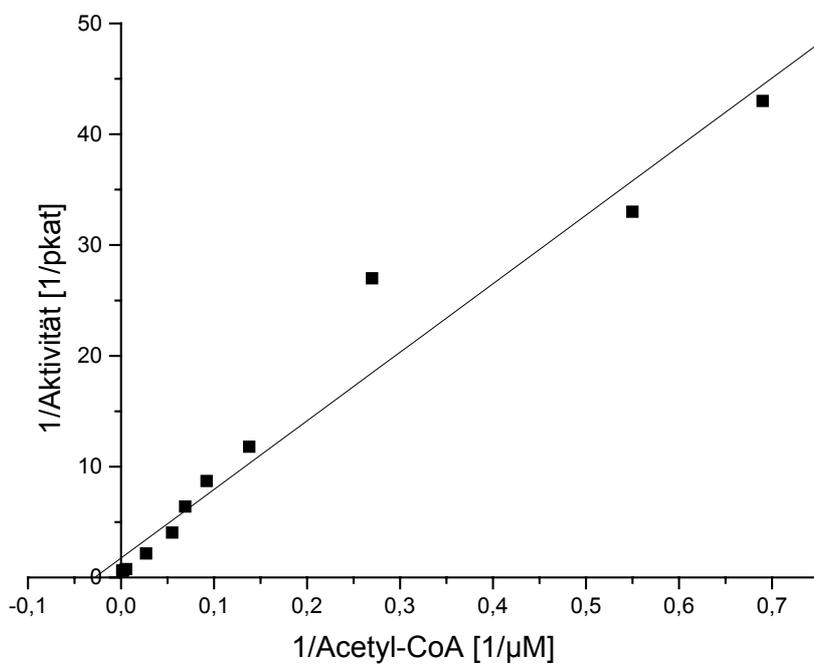


Abbildung 31: Abhängigkeit der Vinorin-Synthase(-His)-Aktivität in Bezug auf die Acetyl-CoA-Konzentration; Lineweaver-Burk-Diagramm; K_M -Wert 60,5 μM , V_{max} 0.6 pkat

4.2 Bestimmung des pH-Optimums

Zur Bestimmung des pH-Optimums wurde der Standard-Aktivitätstest (2) genutzt. Der im Standard-Ansatz enthaltene KPi-Puffer wurde gegen andere Puffer ausgetauscht. Tabelle 17 zeigt die die jeweils verwendeten Puffer.

Das Maximum der Aktivität von 1.65 pkat wurde ermittelt bei einem pH von 7.8 (siehe Abbildung 32). Die spezifische Aktivität betrug am pH-Optimum 3.3 nkat/mg.

Tabelle 17: Puffer für die Bestimmung des pH-Optimums der Vinorin-Synthase

Puffer	pH-Wert
Citrat/NaOH	2.6
	3.0
	3.4
	3.9
	4.5
	5.2
KPi	6
	6.3
	7.2
	7.6
	7.8
	8
	8.6
Tris/HCl	9.1
	9.5
	9.9
	10.5
	11

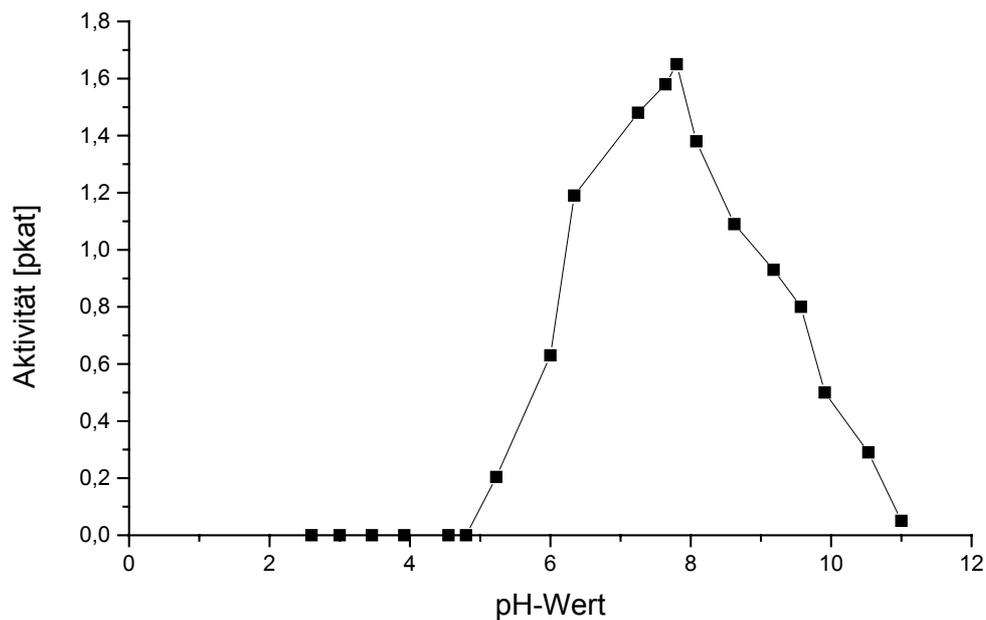


Abbildung 32: pH-Optimum der Vinorin-Synthase

Im pH-Bereich von 2.6 - 4.5 war keine Aktivität der Vinorin-Synthase festzustellen. Das Maximum der Aktivität von 1.65 pkat wurde bei einem pH-Wert von 7.8 ermittelt. Die spezifische Aktivität des Enzyms betrug am pH-Optimum 3.3 nkat/mg.

4.3 Bestimmung des Temperatur-Optimums

Zur Bestimmung des Temperatur-Optimums wurde der Standard-Aktivitätsassay (2) bei Temperaturen zwischen 10 - 50 °C durchgeführt. Das Optimum der Vinorin-Synthase-Aktivität von 1.2 pkat zeigte sich bei einer Temperatur von 35 °C (siehe Abbildung 33).

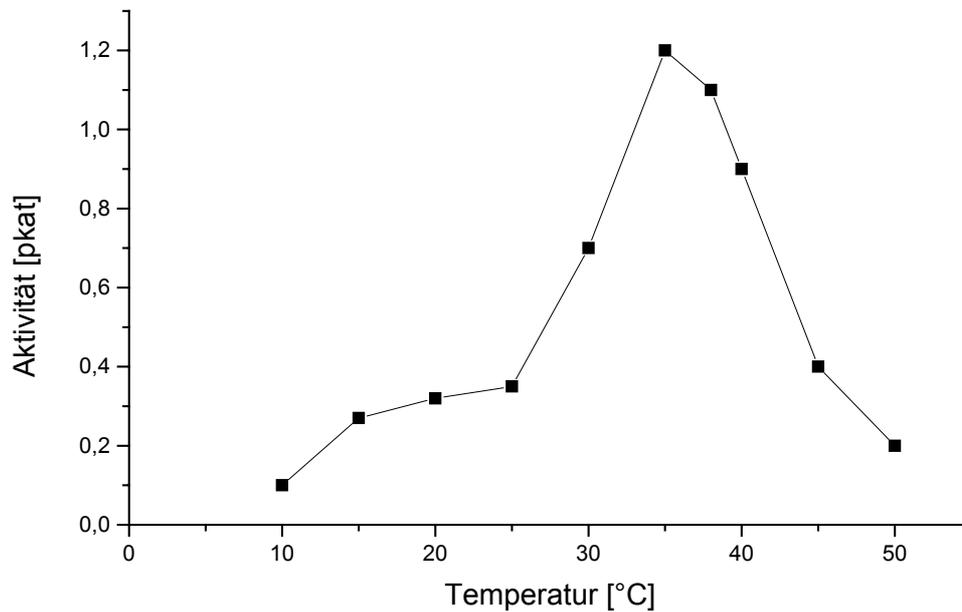


Abbildung 33: Abhängigkeit der Vinorin-Synthase-Aktivität von der Temperatur

4.4 Stabilität der Vinorin-Synthase

Nach 10 monatiger Lagerung der Vinorin Synthase (-His-tag) bei 4°C in 0.1 M KPi-Puffer pH 7 wurde ein Standardaktivitätstest (siehe Kapitel 2) in Anwesenheit von 0.5 µg Vinorin-Synthase, durchgeführt.

Die spezifische Aktivität betrug 1.3 nkat/mg im Vergleich zu 1.4 nkat/mg bei sofortiger Testung nach erfolgter Aufreinigung des Enzyms.

Nach Gefriertrocknung des Enzyms und Rücklösen in 0.1 M KPi-Puffer pH 7 betrug die spezifische Aktivität 1 nkat/mg.

Auch die Lagerung bei -20 °C resultierte in einer spezifischen Aktivität von 1 nkat/mg.

Die Anwesenheit von 20 mM MSH führte zu keiner Verringerung der Enzym-Aktivität.

4.5 Einfluss von Inhibitoren

Zur weiteren Charakterisierung der Vinorin-Synthase wurden eine Reihe von Inhibitor-Experimenten durchgeführt. Es wurden Inhibitoren verwendet, die selektiv mit den Aminosäuren Serin, Cystein und Histidin reagieren.

Für die Inhibitoransätze wurde zunächst 0.5 µg Enzym mit dem jeweiligen Inhibitor 30 min vorinkubiert. Anschließend wurde der Standard-Aktivitätstest durchgeführt (2). Im Test wurde die Vinorin-Synthase ohne His-tag eingesetzt. Die Ergebnisse dieser Inhibitor-Studien sind in Tabelle 18 zusammengefasst. Mit dem Standard-Assay wurde die Aktivität des Wildtyps (0.5 µg Vinorin-Synthase ohne His-tag) bestimmt. Dieser Wert wurde als Aktivität von 100 % herangezogen. Die mit den Inhibitoren ermittelten Aktivitäten wurden zur Aktivität des Wildtyps ins Verhältnis gesetzt (relative Aktivität).

AEBSF, ein selektiver Serin-modifizierender Wirkstoff (Mintz 1993) inhibierte die Aktivität der Vinorin-Synthase zu 100 %, während E-64, ein selektiver Cystein-Inhibitor (Umezawa und Aoyagi 1983), die Aktivität nur um 50 % reduzierte. Inhibierungen von 100 - 50 % waren bei den Serin-Cystein-Inhibitoren TLCK, TPCK und PMSF zu beobachten. Sowohl die Anwesenheit von DEPC (starker, unselektiver Histidin-modifizierender Wirkstoff) (Lundblad 1991), (Miles 1977), als auch von Hg^{2+} -Ionen führten zu einem vollständigen Verlust der Vinorin-Synthase-Aktivität.

Tabelle 18: Inhibitor-Studien mit der Vinorin-Synthase

Inhibitor	Typ	Relative Inhibierung
10 mM AEBSF	Selektiv Ser	100 %
0.025 mM E-64	Selektiv Cys	50 %
0.12 mM TLCK	Ser-Cys	50 %
0.2 mM TPCK	Ser-Cys	100 %
1 mM PMSF	Ser-Cys	58 %
0.2 mM Hg ²⁺	Unselektive SH-Gruppen	100 %
10 mM DEPC	Unselektiv Cys	100 %

Zusammenfassend ergaben sich die in Tabelle 19 aufgeführten Enzymeigenschaften für die Vinorin-Synthase.

Tabelle 19: Enzymeigenschaften der Vinorin-Synthase

Offener Leserahmen	1263 Bp, 421 AS
Molekulargewicht	46 kDa
<i>K_m</i> Gardneral (+His); <i>V_{max}</i>	20 (41.2) μM; 1 (1.71) pkat
<i>K_m</i> Gardneral (-His); <i>V_{max}</i>	7.5 (27.5) μM; 0.7 (1.2) pkat
<i>K_m</i> Acetyl-CoA	60.5 μM
pH-Optimum	pH 7.8
Isoelektrischer Punkt	pH 5.09
Temperatur-Optimum	35 °C
Spezifische Aktivität	1.4 nkat/mg

5 Primärstruktur der Vinorin-Synthase

Der Vergleich der Aminosäuresequenz der Vinorin-Synthase mit bekannten Acetyltransferasen zeigte, dass das Enzym zu einer kleinen Familie von Acetyltransferasen gehört. Zu dieser Familie hat die Vinorin-Synthase Homologien von bis zu 32 %. Bis auf die Primärstruktur ist über diese Familie nicht viel bekannt. Alle Mitglieder der Enzymfamilie sind an der Biosynthese wichtiger pharmazeutischer Wirkstoffe beteiligt. Die höchste Homologie zeigt die Vinorin-Synthase zum Enzym SALAT, Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase aus *Papaver somiferum* (Grothe et al. 2001), welches an der Morphin-Biosynthese beteiligt ist. Weitere Homologien zu Enzymen der Taxol,- Vindolin,- Benzylalkohol,- und Anthranilat-Biosynthese (Yang et al. 1997), (Dudareva et al. 1998), (St-Pierre et al. 1998), (Walker und Croteau 1999), (Walker und Croteau 2000), (Walker et al. 2000), (Walker et al. 2002a), (Walker et al. 2002b), (Hoffmann et al. 2003) liegen zwischen 20 – 30 %. In allen Primärstrukturen der Enzyme dieser Familie ist ein HxxxD, sowie ein DFGWG-Motiv zu 100 % konserviert. Dieses DFGWG-Motiv diente (siehe 3.1) der Synthese des degenerierten Oligonukleotid-Primers (reverse), mit dem es gelang, das erste cDNA-Fragment der Vinorin-Synthase zu synthetisieren. Das Molekulargewicht aller Acetyltransferasen dieser Familie liegt zwischen 46 und 54 kDa.

In der Abbildung 34 sind die Aminosäuresequenzen aller Enzyme der Familie im Vergleich mit der Vinorin-Synthase aufgeführt. Die Enzyme wurden nach absteigender Homologie angeordnet.

VS	-----MAPQMEKVSEELILPSSPTPQSLKCYKISHLDQ---LLLTCHIPFILFYPNPL	50
SALAT	- --MATMYSAAVEVISKETIKPTTPTPSQLKNFNLSLDDQCFPLYYVFTPIILFYPATA	57
DAT	- -MESGKISVETETLSKTLIKPSSPTPQSLSRYNLSYNDQ--NIYQTCVFTSVGFFYENPD	57
DBAT	--MAGSTEFVVRSLERVMVAPSQPSPK--AFLQLSTLDNLPGVRENIFNFTLLVYNAS	55
BEAT	-----MNVTMHSHKLLKPSIPTPNHLQKLNLSLDDQIQIPFYVGLIFHYEFTT LSD	51
DBTNBT	MEKAGSTDFHVKKFDPVMVAPSLPSPK--ATVQLSVVDSLTICRG- IFFTNTLLVFNA-	56
TAT	--MEKTDLHVNLIEKVMVGPSPPLPK--TTLQLSSIDNLPVGRSIFNAFTLLIYNAS	54
BAPT	KKTGSFAEFHVNMIERVMVRECLPSPK--TILPLSAIDNMARAFS---NFTVLLVYAAN	55
PCHBT	-----MSIQIKQSTMVRPAEETPN--KSLWLSNIDMILRTPYSHTGAVLIYKFTQP	49
HCT	-----MKIEVKESTMVKPAABTPQ--QRLWNSVNDL---VVPNFHTPSVYFYRPTG	46
TBT	----MGRFNVDMIERVIVAPCLQSPK--NILHLSPIDNKTRGLT---NILSVYNFTAS	49
VS	DSNLDPAQTS-----QHLSKQSLSKVLTHFYPLAGRINVN---SSVDCNDSGVFVEA	99
SALAT	ANSTGSSNHHD---DLDLKSSLSKTLVHFYPMAGRMIDN---ILVDCDQGINFFTY	109
DAT	GIEIS-----T----IREQLQNSLSKTLVSYYPFAGKVVKN---DYIHCNDDGIEFVEV	104
DBAT	DR-----VSVD---PAKVIRQALSKVLVYYSFAGRLRKKENGDLVECTGEGALFEVA	106
BEAT	NSDIT-----LSKLESSLSETLTYLHYVAGRYNGT---DCVIECNDQIGIYVET	97
DBTNBTDN	-----ISAD---PVKI IREALSKVLVYYPFAGRLRSKEIGELEVECTGDCALFEVF	107
TAT	PSPTM--ISAD---PAKPIREALAKILVYYPFAGRLRETENGDLVECTGECAMFLFT	108
BAPT	MDR---VSAD---PAKVIREALSKVLVYYPFAGRLRNKENGELVECTGQGVLELEF	107
PCHBT	DNNEEDNIHPSSSMYFDANILIEALSKALVPFYPMAGRLKINGD-RYEIDCNAEGALFVF-	108
HCT	SPNFFDG---KV-----LKEALSKALVPFYPMAGRLCRDEDGRIEIDCKGQGVLEFEA	96
TBT	QRVS---VSAD---PAKTIREALSKVLVYYPFAGRLRNTENGDLVECTGECAVEFEA	102
VS	RVQAQLSQAIQNVVEL--EKLDQYLPSAAYPGKIEVNEDVPLAVKISFECCGTAGVH	157
SALAT	KVKIRGKMECFMSQPD--VPLSCLLPSEVVSAS---VPKEALVIVQVNMDCGGTAICSS	164
DAT	RIFTRCRMNDILKYELRSYARDLVLPKRVTVGS---EDTTAIVQLSHEDCGGLAVAFG	159
DBAT	FTMADTDL SVLGDLD DDYSPSLEQLLFC LPPDTD---IEDIHLVIVQVTRFTCGGFVVGVS	163
BEAT	AFDVELHQ-FFTLGEESSNLDLVLVGLSGLFSET---ETPPLAAIQLNMEKCGGLVICGA-	153
DBTNBT	TAMVEDTISVLRDLDDLNP SFQLVFWHPLDTA---IEDLHLVIVQVTRFTCGGI AVGV T	164
TAT	EAMADNELSVLGD FDDSNP SFQLLFS LPLDTN---FKDLSLLVIVQVTRFTCGGFVVGVS	165
BAPT	TAMADSDLSVLTDL DNYPN SFQLIFSLPQD TD---IEDLHLLIVQVTRFTCGGFVVGAN	164
PCHBT	EAESSHVEDFGDFRPNDLHRVMVPTCDYSKG---ISSFPLLMVQLTRFRCGGVSIGFA	165
HCT	ESDGVVDDFGDFAPTL---ELRLIIPAVDYSQG---IQSYALLVLQITHKCGGVSLGVG	150
TBT	MADNFTDLSVLQDFNEYDPSFQLLVFNLRDNDVN---IEDLHLLIVQVTRFTCGGFVVGCT-	159
VS	LSHKIADVLSLATEFLNAWTATCRG-----ETEIVLPENFDLAARHPPP-----	199
SALAT	VSHKIADAATMSTFIRSWASTTKTSRSGGSTAAVTDQKLIPE SFDASLFPSPSERLTSP-	224
DAT	ISHKVADGFTGTIASFMKDWAASACYLS-----SSHHVETPLLVSDSIFPRQ-----	206
DBAT	FCGICDGLGAGQFLIAMGEMARG-----EIKPSSEPIWKRELLKPEDPLYR---	212
BEAT	FNHIGDMFTMSTFTMNSWAKACRVG-----IKEVAHPTFGLAPLMP SAKVLN-	202
DBTNBT	LPHSVCDGRGAAQFVTALAEMARG-----EVKPSLEPIWNRELLNPEDPLH----	212
TAT	FHGVCDGRGAAQFLKGLAEMARG-----EVKLSLEPIWNRELVKLD DPKY----	213
BAPT	VYGSACDAKGFQFLQ SMAEMARG-----EVKPSIEPIWNRELVKLEHCOMP----	212
PCHBT	QHSHVCDGMAHFENNSWARIACLLP-----ALEPVHDRYLHLRPRNPPQIKYSHS-	219
HCT	MOHHAADGASGLHINTWSDMARGLDLTI PPFIDRTLLRARDPPQPQFP HVEYQPPTL	209
TBT	FHHSVSDGFTKGIGQLLKGMGEMARG-----EFKPSLEPIWNREMVKPEDIMY--	207

→

VS	-----VDNTPSEELVDPDENVMKRFVFDKEKIGALRAQASSASEE-----KNFS	243
SALAT	SGMSFTEIPFSSTEEDTEDDKTVSKRFVDFAKITSVREKLQVLMHDN-----YKSRRT	279
DAT	-----DNIICEQFPSTKNOEKTETFPPTPEAIEKLKSKAVEFG-----IEKPT	250
DBAT	--FQYYHFQLICESTFGFTKIYQGSIVITSETINCIKQLREESKE-----FCS	260
BEAT	-----IPPEPSFEGVKFVSKRFVFNENAITRFTLRKEATEEDGDGDDDKKKRPS	252
DBTNBT	--LQLNQFDSICPMLLEFTELQASFINVVDITIEYMKQCVMEECNE-----FCS	260
TAT	--LQFFHFELRAESIVFTEKIYQTYFIIDFETINYIKQSVMEECKE-----FCS	261
BAPT	--FRMSHLQIIHAEVIEEFTKFVQTSVINFEIINHRRIMEERKE-----SLS	260
PCHBT	QFEFFVPSLFTPNELLDGKTNKSQTLFILSREQINTLKQKLDLSNNTT-----RLS	270
HCT	KVTPENTPISEAVEETSVSI-----PKLTRDQINTLKAKSKEDGNT-----VNYS	264
TBT	--LQFDHFDIHPENLNEKSIQAFSTMVISFERINYIKRCMMEECKE-----FFS	255

VS	RVQLVVAYIWKHVIDVTRAKY-----GAKNKFVVVQAVNLRSRMN-PPLPHYAMGNATL	297
SALAT	RVEVVTSLWFTKSVMKSTPA-----GFLP--VVHHAVNLRKKMD-PPLQDVSEGNLSVT	331
DAT	RVEVLTAFLSRCATVAGKSAAKNNNCQSLPFPVLQAINFTLRPI-LELEQNSVGNLVS	309
DBAT	AFEVVSALAWIARTRALQIPH-----SENVKLIFFTAMDMRKLFN-PPLSKGYYGNFVGT	314
BEAT	RVDLVTAFLSKSLIEMDCAKKEQT-KSRPSLMVHMMNLFTRKRTK-LALENDVSGNFFIV	310
DBTNBT	SFEVVAALVWIARTKALQIPH-----TENVKLLFFTAMDLRKLFN-PPLENGYYGNAIGT	314
TAT	SFEVASAMTWIARTRAFQIPE-----SEYVKILFFFGMDMRNSFN-PPLSGYYGNISGT	315
BAPT	SFEIVAALVWLAKIKAFQIPH-----SENVKLLFFTAMDLRRSFN-PPLPHGYGNAFGI	314
PCHBT	TYEVVAALHVWRSVSKARGLFT-----SDHEEIKLIMPVDGRSRINNSLEKGYCNAVVF-	325
HCT	SYEMLAGHVWRSTCMARGLAHDQ-----ETKLYIATDGRSRLR--PSLEPGYFNVIFT	317
TBT	AFEVVALIWLARTKFRIPP-----NEYVKIIFPIDMRFTNSFD-SPLEKGYGNAIGN	309

VS	LEAVDAEWD-----KDFPDLICPLRTSLEKTE-DDHN-HE	331
SALAT	VSALFPATTTTTTNAVNKFTFTINSTSSESQVVLHELHDFIAQMRSEIDKVK-GDKGSLEK	390
DAT	YFSRTIKENDYLNK-----EYTKLVINELRKEKQIKIKNLSREKLT	351
DBAT	VCAMDNVVDLLS-----GSLLRVVRIIK-KAKVSLNE	345
BEAT	VNAESKITVAPKIT-----DLTESLGSACGEIIEV-AKVDDAEV	349
DBTNBT	AVAMDNVQDLLN-----GSLLRAIMIIK-KAKADLKD	345
TAT	ACAMDNVQDLLS-----GSLLRAIMIIK-KSKVSLND	346
BAPT	ACAMDNVHDLSS-----GSLLRTIMIIK-KSKFSLHK	345
PCHBT	AVCTATVGDLSN-----PLDTAGKVQEAFTLKGDDDYLR	363
HCT	TPPIAVAGDIQSKPIWYAA-----SKLHDALARMDNDYLR	355
TBT	ACAMDNVVDLLN-----GSLLYALMLIK-KSKFALNE	340

←

VS	LLKGMTCLYXLEPQEL-----LSFTS-WCRLGFDLDFGWGKPLSACTTT-----	375
SALAT	VIQNFASGHDAIKKINDVEVFTINFWISS-WCRMGLYEIDFGWGKPIWVVDPN----I	445
DAT	TYVAQMEEFVKSLKEFDISNFLDIDAYLSDSWCRFPFYDDFGWGKPIWVCLFQP----Y	407
DBAT	HFTSTFT-IVTPRSGSDESINYENIVGFGD-WRRLGFDEVDFGWGCHADNVSLVQHGLKDV	403
BEAT	VFTSSMVLNSVREFYYEWGKGEKNVFLYTS-WCRFPLYEVDFGWGCFPSLVDTTAVP----	404
DBTNBT	NYSRSFTRVVTNPYSLDVNKKSDNILALSD-WRRLGFYEADFGWGCPNLVSSLQR-LENG	403
TAT	NFK-SFTRAVVKPSELVDNMHNENVAFAD-WSRLGFDEVDFGWGNAVSVSPVQQ-QSA	402
BAPT	ELNSKFTVMSS-SVVDVNTKFEVVSISD-WRHSIYEVDFGWGCDAMNVSTMLQQQEHE	403
PCHBT	AIDHTESKPLVPYMGSEPTLYPNVLVNSWGRIPYQAMDFGWGSEFTTFFGIS----N	419
HCT	YLELQPDALKALVRGAHTFKCPNLGITS----WSRLPIHADFGWGRPIFMGPGGIAYEGL	401
TBT	NFKSRILTKPFT-STLDANMKHENVVGCGD-WRNLGFYEADFGWGNAVNVSPMQQREHE	398

VS	FPKRNAALMDTRSCDGVEA-WLP-----MAEDEMAMLPVLLSLVDSDFSK-----	421
SALAT	KPNKNCFFMNDTKCGEGIEV-WAS-----FLEDFTDMAKFLHLSEILELI-----	490
DAT	IKNCFTVVMMDYPCDDYGIEAIV-----SFEQEKMSAEKNEQLLQFVSN-----	453
DBAT	SVVQSYFFTFIRPPKNNPD-GIK-ILSEMPPSIVKSKFEMETMTNKYVTKP-----	454
BEAT	FGILVLMFTDEAPACDGI AVR-----ACLSEHDMIQFQQHHQLLSYVY-----	447
DBTNBT	LPMFSTFFTYLLPAKNKSD-GIKLLLSOMPPTTLKSFKIVMEAMIEKYVSKV-----	455
TAT	LAMQNYFFFTLKPSKNKPD-GIK-ILMFLPLSKMKSFKIEAMEAMKKYVAKV-----	453
BAPT	KSLPTYFSFTFLQSTKNMPD-GIK-MLMFMPPSKLKKFKIEIAMIKKYVTKVCP SKL-	459
PCHBT	IFYDQCFLIPSRDCDGSMTLAIN-----LFSSHLSRFKKYFYDF-----	459
HCT	SFILPSP TNDGSQSVAISLQAEH-----MKLF----EKF-LYDF-----	435
TBT	LAMQNYFFFLRSAFTKNMID-GIK-ILMFMPSMVKPFKIEMEVTINKYVAKICNSKL-	454

Abbildung 34: Sequenz-Alignment der Vinorin-Synthase mit allen bekannten Enzymen der kleinen Acetyltransferase-Familie

SALAT, Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase aus *Papaver somniferum* (Grothe et al. 2001); DAT, Deacetylvindoline-4-O-Acetyltransferase aus *Catharanthus roseus* (St-Pierre et al. 1998); DBAT, 10-Deacetylbaaccatin-III-10-O-Acetyltransferase aus *Taxus cuspidata* (Walker und Croteau 1999); BEAT, Benzylalcohol-Acetyltransferase aus *Clarkia breweri* (Dudareva et al. 1998); DBTNBT, Taxoid-„C13-side chain“-N-benzoyltransferase aus *Taxus* (Walker et al. 2002b); TAT, Taxadienol-O-Acetyltransferase aus *Taxus cuspidata* (Walker et al. 2000); BAPT, C-13-Phenylpropanoid-“side chain“-CoA-Acyltransferase aus *Taxus* (Walker et al. 2002a); PCHBT, Anthranilat-N-Hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase aus *Dianthus caryophyllus* (Yang et al. 1997); HCT, Shikimat Hydroxycinnamoyltransferase aus Tabak (Hoffmann et al. 2003); TBT, Taxan-2alpha -O-benzoyltransferase aus *Taxus* (Walker und Croteau 2000).

Homologien zu den Enzymen sind schwarz unterlegt, Aminosäurefragmente nach Proteinreinigung sind grau unterlegt, Primer zur Synthese des ersten cDNA-Fragments sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Das HxxxD Motiv ist unterstrichen. Die Enzyme sind nach absteigender Homologie geordnet.

6 Mutationen der Vinorin-Synthase

Über das katalytische Zentrum der Acetyltransferasen ist kaum etwas bekannt. Bei den Arylamin-N-acetyltransferasen (NAT-Familie) wurde durch Ermittlung der Kristallstruktur deutlich, dass eine katalytische Triade Cys-His-Asp am Reaktionsmechanismus beteiligt ist (Rodrigues-Lima et al. 2001),

(Sinclair et al. 2000). Für die Salutaridinol-Acetyltransferase wird ebenfalls eine katalytische Triade Ser-His-Cys vorgeschlagen (Grothe et al. 2001). Brown (Brown et al. 1994) postulierte, dass bei der Carnitin-Palmitoyltransferase nur Histidin und Aspartat, in einem der klassischen Triade analogen Mechanismus, an der katalytischen Reaktion beteiligt sind. Es wird also entweder eine katalytische Triade diskutiert an der Histidin, Aspartat und Serin oder Cystein beteiligt sind oder es wird von einer katalytischen Diade ausgegangen (Histidin, Aspartat). Um diese Theorien für die Vinorin-Synthase zu überprüfen wurde beschlossen, alle konservierten Histidine, Aspartate, Serine und Cysteine in der Sequenz der Vinorin-Synthase gegen Alanin auszutauschen und so deren Funktion im Reaktionsmechanismus zu überprüfen. Sollten die drei Aminosäuren Serin, Histidin und Cystein tatsächlich exklusiv die Reaktion der Vinorin-Synthase katalysieren, so müsste jeweils ein Austausch gegen Alanin das Enzym völlig inaktivieren.

6.1 Primer-Design und PCR

Insgesamt wurden 13 Aminosäuren in der Vinorin-Synthase mutiert. Neben allen konservierten Aminosäuren wurden auch Asparagin an Position 293 und Serin an Position 413 ausgetauscht. Sie dienen als Kontrolle, denn da sie nicht konserviert sind, wurde ihnen auch keine katalytische Funktion zugeschrieben. Als Template für die PCR wurde das Vinorin-Synthase pQE2-Konstrukt verwendet. Die Mutationen wurden mit dem QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit gemäß den Anleitungen des Herstellers durchgeführt. Als erstes mussten geeignete Primer synthetisiert werden, welche die Punktmutationen enthielten (siehe Tabelle 20). Die jeweils ausgewählten Aminosäuren wurden gegen Alanin ausgetauscht. Die Bedingungen für die PCR und den Reaktionsansatz sind in 4.3.2 beschrieben.

Tabelle 20: Primersequenzen für die Mutationen der Vinorin-Synthese

Mutation	Primersequenz
S16A	for:5`-GAGCTGATTCTACCAGCGTCTCCAACACCCCAAAGC-3` rev:5`-GCTTTGGGGTGTGGAGACGCTGGTAGAATCAGCTC-3`
S29A	for:5`-GCTTGAAATGCTATAAAATTGCGCACCTAGATCAAGTG-3` rev:3`-CACTTGATCTAGGTGCGCAATTTTATAGCATTTC AAGC-3`
S68A	for:5`-CAGCACCTGAAACAATCTTTGGCGAAAGTGTTAACTCAC-3` rev:5`-GTGAGTTAACTTTTCGCCAAAGATTGTTTT CAGGTGCTG-3`
S243A	for:5`-GAGGAGAAGAATTTTCGCGCGGGTACAGCTTGTT-3` rev:5`-AACAGCTGTACCCGCGCGAAATTCTTCTCCTC-3`
S413A	for:5`-CCTGTTGAATTGGTGGCGCTTG TAGACAGCG-3` rev:5`-CGCTGTCTACAAGCGCCACCAATTCAACAGG-3`
C89A	for: 5`-CGTAAATTCTTCG TAGACGCGAATGATTCTGGAG-3` rev:5`-CTCCAGAATCATTGCGGTCTACGGAAGAATTTACG-3`
C149A	for:5`-CAAATCAGTTTCTTTGAGGCGGGAGGCACGGCCATTGG-3` rev:5`-CCAATGGCCGTGCCTCCCGCCTCAAAGAAACTGATTTTG-3`
D32A	for:5`-GAGCTGATTCTACCAGCGTCTCCAACACCCCAAAGC-3` rev:5`-CGTTAATAACAGTTGCGCTAGGTGGGAAATTTTATAGCA-3`
D164A	for:5`-TCGCATAAGATAGCTGCGGTATTGTCCCTGGCC-3` rev:5`-GGCCAGGGACAATACCGCAGCTATCTTATGCGA-3`
D359A	for:5`-GGCTTGGCTTTTATGCGTTGGATTTTCGGCTGGGGG-3` rev:5`-CCCCAGCCGAAATCCAACGCATAAAAGCCAAGCC-3`
D361A	for:5`-GGCTTTTATGGACTTGGCGTTCGGCTGGGGGAAGCC-3` rev:5`-GGCTTCCCCCAGCCGAACGCCAAGTCATAAAAGCC-3`
H160A	for:5`-GGTGTCCACTTATCGGCGAAGATAGCTGATG-3` rev:5`-CATCAGCTATCTTCGCCGATAAGTGGACACC-3`
Asn293A	for:5`-CCTCACTATGCTATGGGGGCGATCGCCACACTATTATTC-3` rev:5`-GAATAATAGTGTGGCGATCGCCCCATAGCATAGTGAGG-3`

Buchstaben vor den Positionsnummern stehen für die auszutauschende Aminosäure; Buchstaben hinter den Zahlen stehen für die mutierten Aminosäuren

Nach erfolgreicher PCR musste das Template durch einen Restriktionsverdau mit *Dpn* I entfernt werden. Dieses Enzym hydrolysiert nur methylierte, d.h. aus *E. coli* isolierte DNA. DNA, die in der PCR amplifiziert wurde, wird nicht angegriffen. Das Enzym *Dpn* I konnte dem PCR-Ansatz direkt zugesetzt werden. Die Mischung wurde 3 h bei 37 °C inkubiert. Der Verdau bestand aus: 40 µl PCR-Ansatz, 1 µl *Dpn* I (10 U/µl), 4 µl Puffer 4, 4 µl Wasser.

Der Ansatz des Restriktionsverdaus (9 µl) konnte direkt für die Transformation in TOP 10 Zellen verwendet werden. Nach erfolgreicher Transformation und Aufreinigung der Transformationsprodukte bestätigte die Sequenzierung, den Erfolg der 13 Mutationen.

6.2 Expression und Aufreinigung der mutierten Enzyme

Zur Expression der mutierten Enzyme wurden die Plasmide in M 15 Zellen transformiert. Die Expression und Aufreinigung entsprach der des Wildtyps. Es wurden jeweils 10 ml Übernachtskultur in 2 L LB-Kan-Amp-Medium unter Zusatz von 0.5 mM IPTG gegeben und wie in 3.4 beschrieben inkubiert, geerntet und über eine Ni-NTA-Säule gereinigt (siehe Abbildung 35).

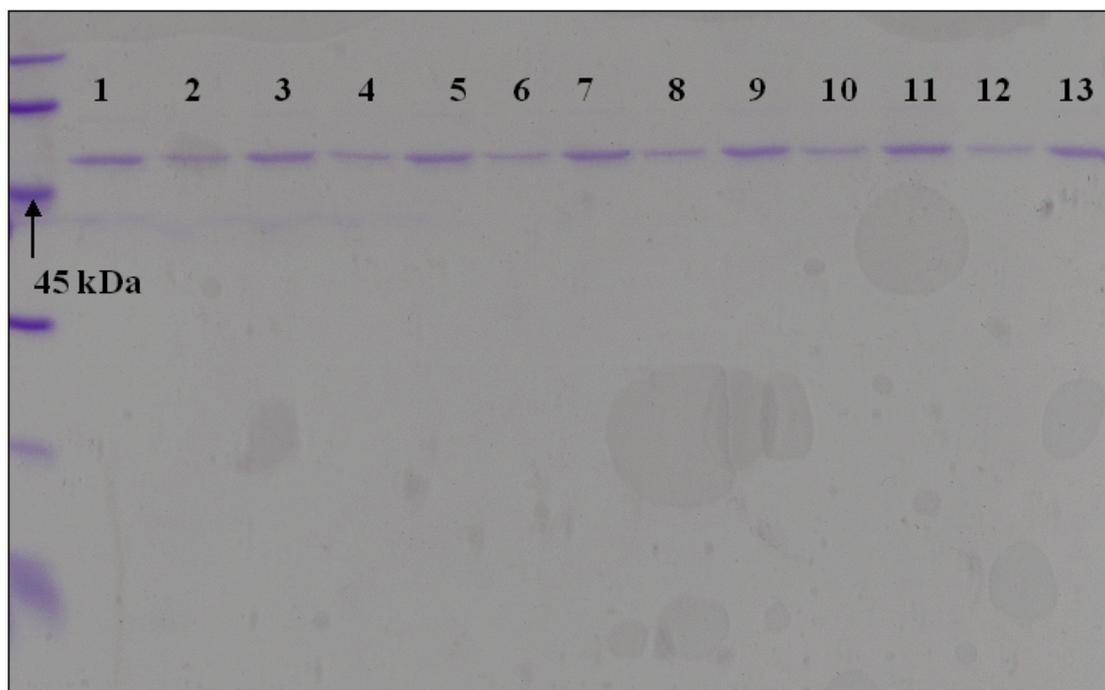


Abbildung 35: SDS-Gel der mutierten Enzyme nach der Reinigung über eine Ni-NTA-Säule

Die Bande ganz links zeigt Standardproteine. Die Bande mit einer Größe von 45 kDa ist mit Pfeil gekennzeichnet. Banden 1-13 zeigen alle 13 mutierten Enzyme. (Reihenfolge entspricht Tabelle 20)

Es wurden je 50 μ l gereinigtes Protein auf das Gel aufgetragen. Nach erfolgter Reinigung wurde mit der Charakterisierung der mutierten Enzyme begonnen.

6.3 Kinetik der mutierten Enzyme

Die Mutationen der Vinorin-Synthase wurden in zwei Gruppen durchgeführt. In der ersten Gruppe wurden die folgenden sechs Aminosäuren jeweils gegen Alanin ausgetauscht: Serin 29, Cystein 89, Cystein 149, Histidin 160, Asparagin 293, Serin 413. Von diesen sechs Mutationen wurden neben der Aktivität die K_M - und V_{max} -Werte bestimmt. Nach Auswertung dieser Ergebnisse schloss sich die Herstellung einer zweiten Gruppe an. In dieser wurden die restlichen sieben konservierten Serine und Aspartate gegen Alanin ausgetauscht. Um festzustellen, welche Aminosäuren an der katalytischen Reaktion beteiligt sind, wurde bei dieser zweiten Gruppe nur getestet, ob die Mutanten noch katalytische Aktivität aufwiesen. War dies der Fall, so wurde diese Aktivität ins Verhältnis zur Aktivität des Wildtyps gesetzt (relative Aktivität). Auf die Bestimmung der K_M - und V_{max} -Werte wurde, wegen der geringen Menge an verfügbarem Substrat, verzichtet.

6.3.1 Kinetische Untersuchungen der ersten Mutationsgruppe

Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde der Standard-Enzymaktivitätstest (siehe 2) durchgeführt und mittels HPLC quantitativ untersucht.

Der Austausch von Serin 29 gegen Alanin resultierte in einer starken Veränderung der Reaktionskinetik im Vergleich zum Wildtyp. Niedrige Substratkonzentrationen zeigten einen relativ hohen Umsatz zum Produkt. Ab einer sehr niedrigen Menge von Substrat (ca. 7 μ M) stieg der Umsatz jedoch

nicht weiter an, völlig im Gegensatz zum Wildtyp, bei dem der Umsatz bis zu Substratmengen von 40 μM anstieg. Der K_M -Wert wurde bestimmt mit einer Proteinmenge von 0.5 μg , einer konstanten Acetyl-CoA-Konzentration von 72 nmol und Substratkonzentrationen von 0.071 - 1.2 nmol. Der K_M -Wert betrug 4.65 μM und V_{max} 0.2 pkat (siehe Abbildung 36 und Abbildung 37).

Der Austausch von Histidin 160 gegen Alanin resultierte in einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität. Selbst bei einer Variation der eingesetzten Enzymmenge von 0.2 - 15 μg pro Inkubationsansatz konnte keine Aktivität festgestellt werden, so dass auf die Bestimmung der K_M - und V_{max} -Werte verzichtet werden musste.

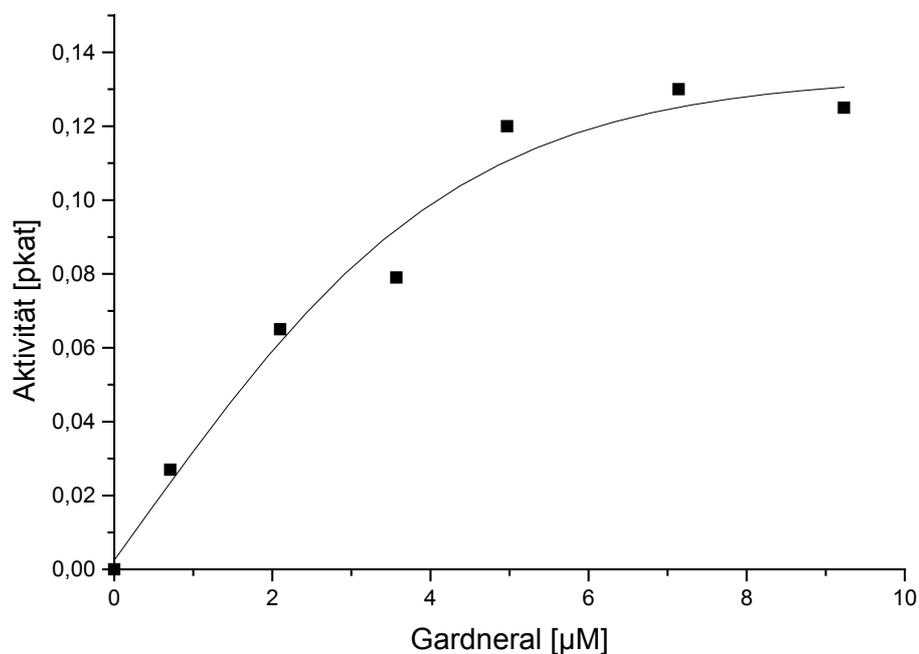


Abbildung 36: Abhängigkeit der S29A-Aktivität von der Gardneral-Konzentration; Michaelis-Menten-Kinetik

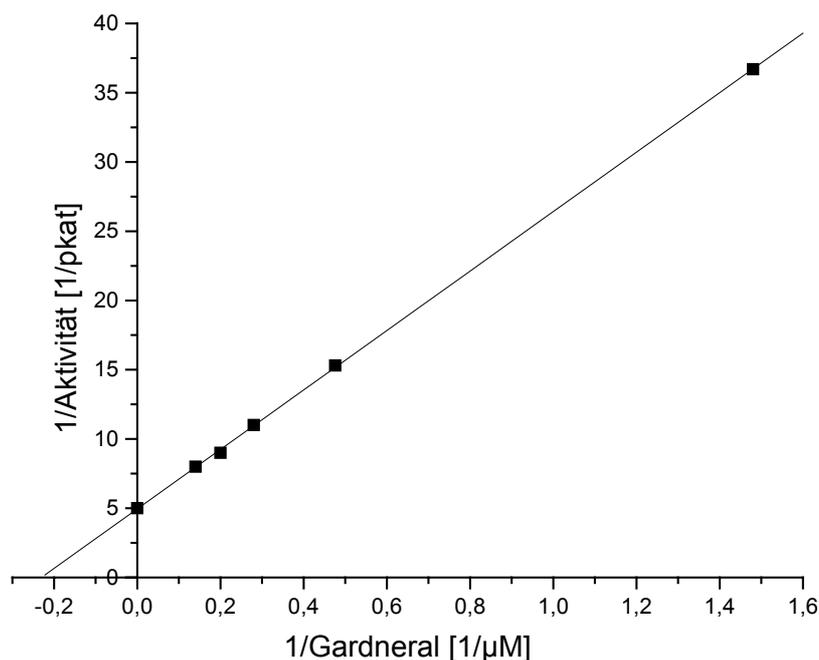


Abbildung 37: Abhängigkeit der S29A-Aktivität von der Gardneral-Konzentration; Lineweaver-Burk-Diagramm; K_M -Wert 4.65 μM , V_{max} 0.2 pkat

Der Austausch von Cystein 149 gegen Alanin resultierte in einer ähnlichen Reaktionskinetik wie bei der oben besprochenen Mutante S29A. Die Sättigung des Enzyms tritt hier bei noch niedrigeren Substratkonzentrationen ein. Der K_M -Wert von 1.06 μM wurde bestimmt bei einer eingesetzten Proteinmenge von 0.37 μg und Gardneralkonzentrationen von 0.07 - 0.71 nmol. V_{max} betrug 0.07 pkat (siehe Abbildung 38 und Abbildung 39).

Der Austausch der Aminosäure Cystein an Position 89 resultierte in einem apparenten K_M -Wert von 27 μM . Der K_M -Wert wurde bestimmt mit einer Proteinmenge von 950 ng und Gardneralkonzentrationen von 0.071 - 5.77 nmol. (siehe Abbildung 40).

Die Kinetik des Muteins S413A wurde in Anwesenheit von je 0.55 μg Vinorin-Synthase untersucht. Die Gardneralkonzentrationen variierten von 0.714 - 4.99 nmol. Der K_M -Wert wurde mit 29 μM bestimmt und V_{max} betrug 0.8 pkat (siehe Abbildung 41). Der Austausch der Aminosäure C89 und S413 gegen Alanin resultierte jeweils in einer sigmoiden Reaktionskinetik. Bei einem

solchen Verhalten ist eine Linearisierung nicht möglich und es können lediglich apparente K_M -Werte aus der Michaelis-Menten-Kinetik abgelesen werden.

Bei der Bestimmung des K_M -Wertes von Asn293A wurden 0.26 μg Protein und Gardneralkonzentrationen von 0.714 - 3.57 nmol eingesetzt. Der K_M -Wert betrug 25 μM und der V_{max} -Wert ergab 1.01 pkat (siehe Abbildung 42 und Abbildung 43).

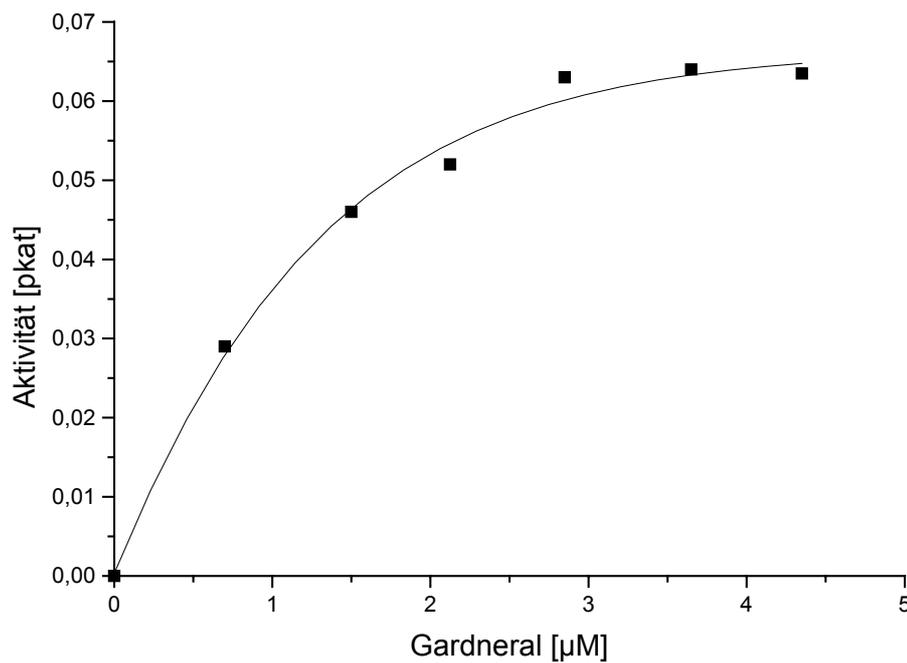


Abbildung 38: Abhängigkeit der C149A-Aktivität von der Gardneral-Konzentration; Michaelis-Menten-Kinetik

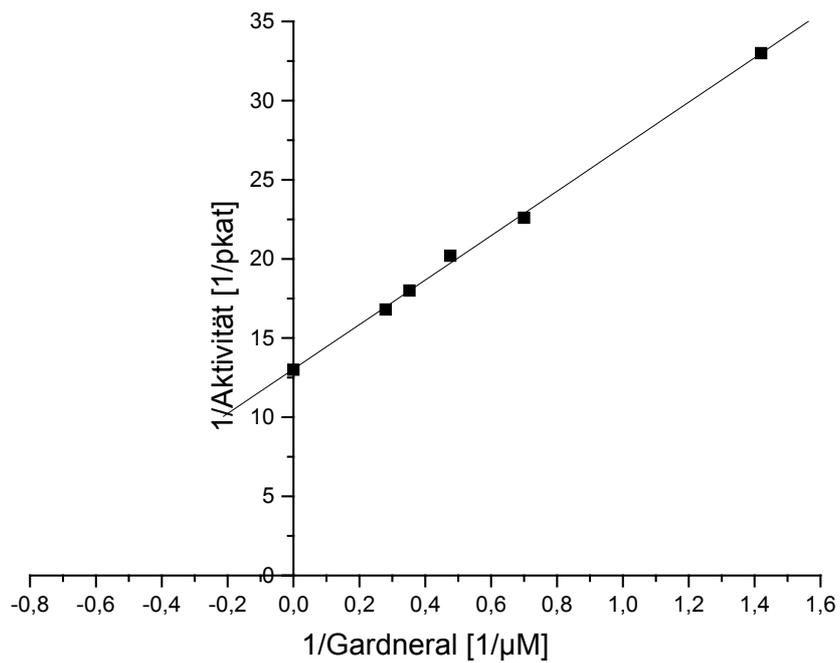


Abbildung 39: Abhängigkeit der C149A-Aktivität von der Gardneral-Konzentration;
Lineweaver-Burk-Diagramm; K_M -Wert $1,06 \mu\text{M}$, V_{max} $0,07 \text{ pkat}$

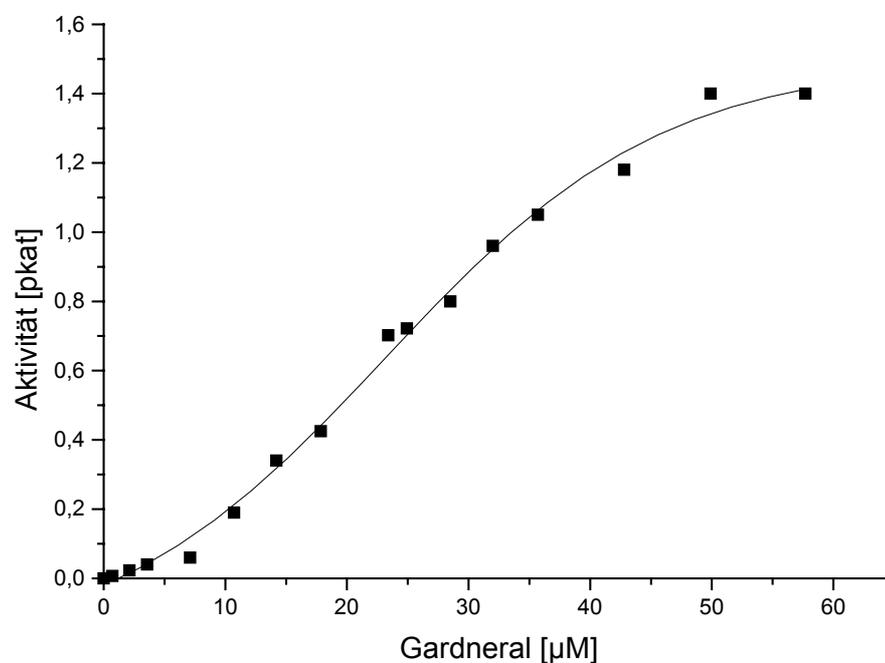


Abbildung 40: Abhängigkeit der C89A-Aktivität von der Gardneral-Konzentration;
Michaelis-Menten-Kinetik (apparenter K_M -Wert $27 \mu\text{M}$)

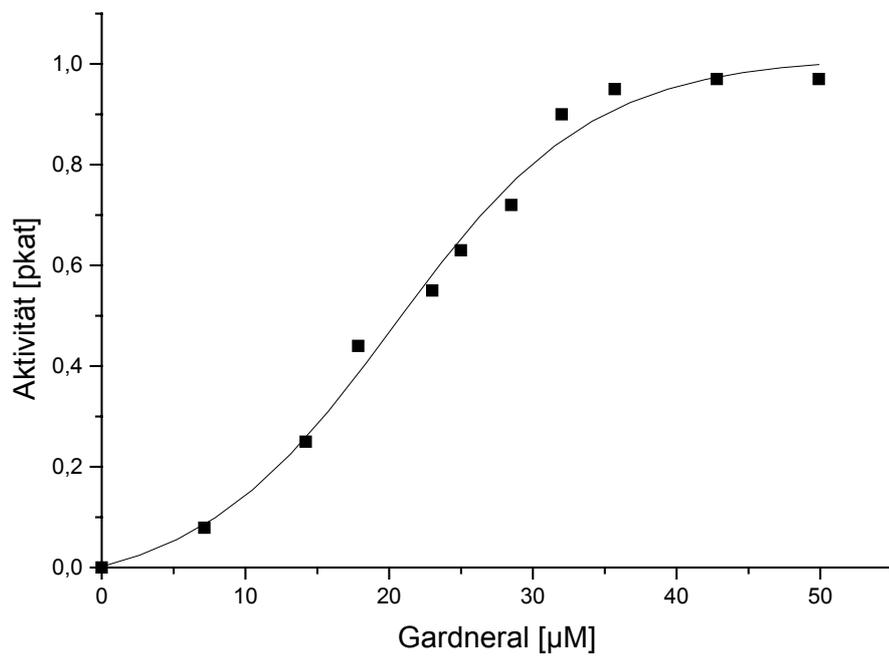


Abbildung 41: Abhängigkeit der S413A-Aktivität von der Gardneral-Konzentration; Michaelis-Menten-Kinetik (apparenter K_M -Wert 25 μM)

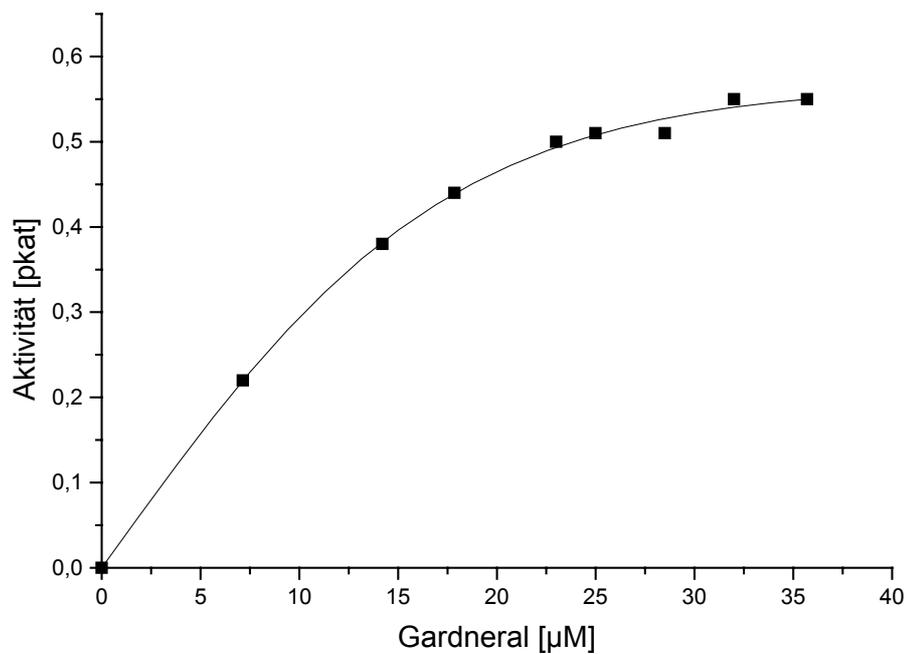


Abbildung 42: Abhängigkeit der Asn293A-Aktivität von der Gardneral-Konzentration;
Michaelis-Menten-Kinetik

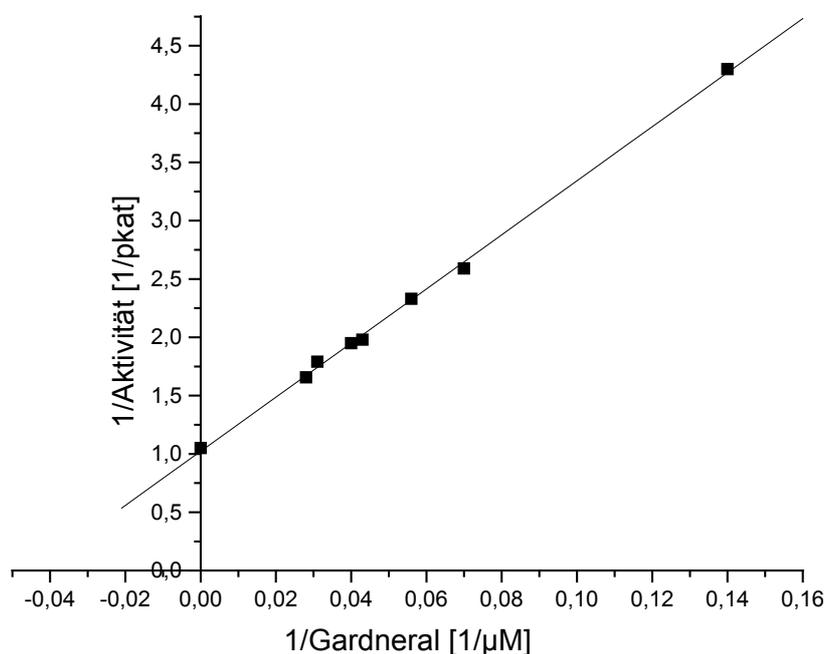


Abbildung 43: Abhängigkeit der Asn293A-Aktivität von der Gardneral-Konzentration;
Lineweaver-Burk-Diagramm; K_M - Wert 25 μM , V_{max} 1.01 pkat

Tabelle 21: Kinetische Eigenschaften der Mutanten der Vinorin-Synthase

Enzym	K_M [μM] oder apparenter K_M [μM]	Proteinmenge- /Inkubation [ng]	10x kcat [s^{-1}]	V_{max} [pkat]
Wildtyp	7.5 (27.5)	500	1.0	0.7 (1.2)
S29A	4.65	500	0.16	0.2
C89A	27	950	-	1.4
C149A	1.06	370	0.079	0.07
H160A	n.d.	490	n.d.	n.d.
Asn293A	25	550	0.8	1.01
S413A	25	550	-	1.0

Für die erste Mutationsgruppe ergaben sich die in Tabelle 21 zusammengefassten Daten.

Wie Tabelle 21 veranschaulicht, weichen lediglich die K_M -Werte der Mutationen S29A und C149A stark vom Wildtyp ab. Der K_M -Wert der Mutante H160A war nicht zu bestimmen, da sie durch einen völligen Aktivitätsverlust charakterisiert war. Der Aktivitätsverlust dieses Muteins zeigt deutlich, dass das basische Histidin, das alle Acetyltransferasen im Motiv HXXXD aufweisen, unverzichtbar ist für die katalytische Aktivität des Enzyms.

In dieser Gruppe von Mutanten war es jedoch nicht möglich, weitere Aminosäuren aufzufinden, die exklusiv am Reaktionsmechanismus beteiligt sind und zur postulierten katalytischen Triade bzw. Diade gehören. Dies hätte sich am völligen Aktivitätsverlust der Mutante zeigen müssen. Deshalb wurde die zweite Gruppe untersucht, bei der alle übrigen konservierten Serine und Aspartate mutiert wurden, um weitere Teilnehmer des katalytischen Zentrums zu identifizieren.

6.3.2 Untersuchung der zweiten Mutationsgruppe der Vinorin-Synthase

Um weitere Mitglieder des katalytischen Zentrums der Vinorin-Synthase zu identifizieren, wurde eine zweite Mutationsgruppe durchgeführt. Es wurde auf die Bestimmung der kinetischen Parameter wie K_M -Wert und V_{max} verzichtet und lediglich die Aktivität der jeweiligen Muteine bestimmt und deren spezifische Aktivität ermittelt (siehe Tabelle 22).

Die Aktivitäten wurden mit dem Standardaktivitätstest (siehe 2) in Anwesenheit von 0.5 μg Protein ermittelt und mit HPLC ausgewertet.

Tabelle 22: Spezifische Aktivitäten der zweiten Mutationsgruppe

Mutation	Spezifische Aktivität [nkat/pmol]
Wildtyp	1.4
S16A	1.02
D32A	0.2
S68A	1.4
D164A	0
S243A	0.24
D359A	1.4
D361A	0.5

Schließlich wurden die Aktivitäten aller 13 Mutationen ins Verhältnis zur Aktivität des Wildtyp gesetzt (relative Aktivität) (siehe Tabelle 23).

Tabelle 23: Relative Aktivität aller 13 Mutanten im Verhältnis zum Wildtyp (-His)

Enzym	Relative Aktivität
Wildtyp	100 %
S68A	100 %
C89A	100 %
S413A	100 %
D359A	100 %
S16A	71 %
Asn293A	68 %
D361A	35 %
S29A	25 %

Enzym	Relative Aktivität
S243A	17 %
D32A	14 %
C149A	10 %
H160A	0 %
D164A	0 %

Die Mutationen H160A und D164A resultierten in einem vollständigen Verlust der Enzymaktivität. Auch der Austausch der Aminosäuren Aspartat 361 und 32, sowie Cystein 149 und Serin 29 und 243 hatte eine drastische Abnahme der Enzymaktivität zur Folge. Alle anderen Mutationen zeigten eine dem Wildtyp ähnliche Aktivität (siehe Tabelle 23).

7 Kristallisation und Röntgenstrukturanalyse der Vinorin-Synthase

Zur Ermittlung der dreidimensionalen Struktur der Vinorin-Synthase war zunächst die Kristallisation des Enzyms notwendig.

Wenn ein Röntgenstrahl auf einen Kristall trifft, so wird der einfallende Strahl an den Netzebenen des kristallinen Gitters gebeugt. Interferenzen der an parallelen Netzebenen gebeugten Strahlen führen zur Verstärkung oder Auslöschung in bestimmten Richtungen. Bei Beugung an einem kristallinen Gitter, wie es in einem Monokristall gegeben ist, gibt es nur räumlich stark begrenzte Bereiche, in denen die Verstärkung des gebeugten Strahls möglich ist (Röntgenreflexe). Alle übrigen Bereiche des Raums sind ausgelöscht. Die Messung des Röntgenbildes beschränkt sich daher auf die Aufnahme der Röntgenreflexe mit einem Detektor. Da ein Proteinkristall aus mehreren gegeneinander verschobenen kristallinen Blöcken besteht, wird der Röntgenstrahl nur bis zu einem bestimmten maximalen Winkel θ_{\max} gebeugt,

der nach dem Bragg'schen Gesetz mit dem kleinsten beobachtbaren Abstand der Netzebenen d_{\min} verknüpft ist (Scharff 2000) (siehe Gleichung [1]).

$$d_{\min} = \frac{\lambda}{2 \sin \theta_{\max}} \quad [1]$$

d_{\min} definiert die Auflösung der Kristallstruktur und wird in Ångström (Å) angegeben.

Fehlorderungen wie z.B. Verzwilligung des Kristalls führen dazu, dass die entstehenden Beugungsmuster nur schwer auswertbar sind. Für die Röntgenstrukturanalyse werden daher gut geordnete Monokristalle benötigt, die ausreichende Größe, Stabilität und Auflösung aufweisen. Der erste Schritt für eine erfolgreiche Strukturaufklärung ist daher die Suche nach geeigneten Kristallisationsbedingungen (Buerger 1977), (Scharff et al. 2001a), (Scharff et al. 2001b), (Koepke et al. 2002).

Variable, wie pH-Wert, Ionenstärke, Art und Konzentration des Präzipitanten sowie die Proteinkonzentration, beeinflussen die Kristallisation entscheidend. Aus diesem Grund wurde zunächst eine Vielzahl möglichst unterschiedlicher Puffer getestet, um geeignete Kristallisationsbedingungen zu finden. Für die Kristallisation wurde die Vinorin-Synthase im pQE2-Vektor exprimiert, an der Ni-NTA-Säule aufgereinigt und der N-terminale His-tag abgespalten.

Für die ersten Kristallisationsexperimente wurden die Puffer des „Crystal Screen“ und des „Crystal Screen2“ von Hampton Research verwendet, die das Testen von insgesamt 100 unterschiedlichen Kristallisationsbedingungen ermöglichen. Die Kristallisation wurde dabei mit Proteinkonzentrationen von 1 - 10 mg/ml durchgeführt (Durchführung siehe 5).

Bei dem Puffer 39 (2.0 M Ammoniumsulfat, 2 % PEG 400, 0.1 M HEPES pH 7.5) des „Crystal Screen“-Kits war nach 5 Tagen ein monokristalliner Kristall gewachsen der eine Größe von ca. 100 µm aufwies (siehe Abbildung 44). Färbeexperimente (IZIT) und erste von Herrn Dr. Fritzsch am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt durchgeführte Messungen an einem Einkreisdiffraktometer mit $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung zeigten, dass es sich um einen

Proteinkristall handelte. Dieser wies jedoch nur eine geringe Beugungskraft auf.

Als nächstes mussten die Kristallisationsbedingungen so optimiert werden, dass reproduzierbar Monokristalle mit maximaler Beugungskraft erhalten werden konnten. Hierfür wurde der Kristallisationspuffer 39 (2.0 M Ammoniumsulfat, 2 % PEG 400, 0.1 M HEPES pH 7.5) des „Crystal Screen“-Kits bezüglich des pH-Wertes, der Konzentration an PEG und der Konzentration an Ammoniumsulfat variiert.

Es wurde ein Screening mit 100 Puffern entwickelt. Die Proteinkonzentrationen der Vinorin-Synthase betragen 3, 5, 8 und 10 mg/ml. Die Tropfen bestanden aus 1 μ l Protein, 1 μ l Puffer. Das Reservoirvolumen betrug 700 μ l.

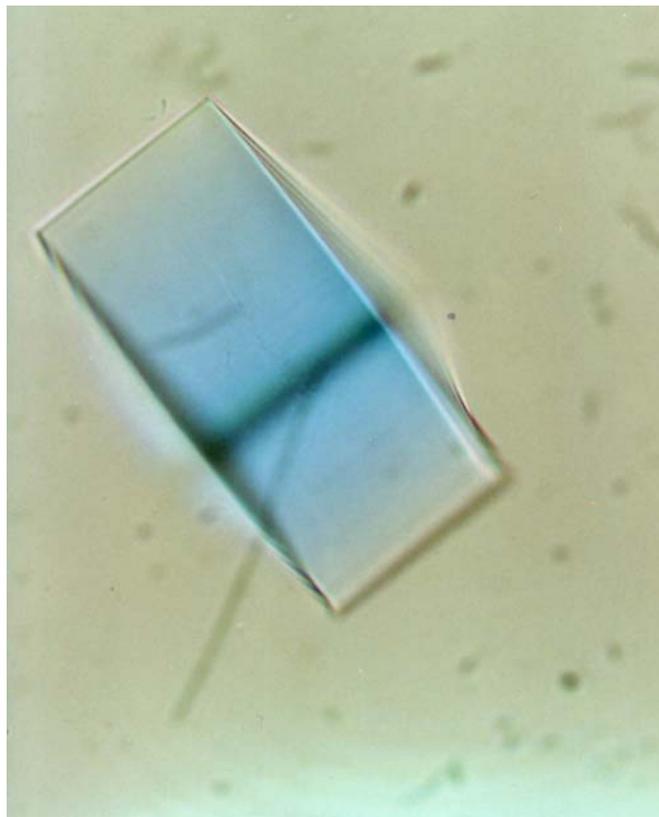


Abbildung 44: Erster Vinorin-Synthase-Kristall

Tabelle 24: Screening I

Puffer	Ammoniumsulfat	PEG 400 %	Nr.
0.1 M MES pH 6.5	1.6 M	1.5	1
		2	2
		3	3
		5	4
		8	5
0.1 M MES pH 6.5	1.8 M	1.5	6
		2	7
		3	8
		5	9
		8	10
0.1 M MES pH 6.5	2.0 M	1.5	11
		2	12
		3	13
		5	14
		8	15
0.1 M MES pH 6.5	2.2 M	1.5	16
		2	17
		3	18
		5	19
		8	20

Nummer 21 – 40, 41 – 60, 61 – 80 und 81 – 100 sind analog zu Nummer 1 – 20, nur der pH-Wert variiert jeweils.

Nr. 21 - 40 HEPES

pH 7

Nr. 61 - 80 Tris

pH 8

Nr. 41 - 60 HEPES

pH 7.5

Nr. 81 - 100 Tris

pH 8.5

Die Kristalle wuchsen bei RT. Nach 5 Tagen wurden die Ansätze mikroskopisch kontrolliert. Die Auswertung ergab, dass die Vinorin-Synthase nur bei PEG-Konzentrationen bis 2 %, bei Ammoniumsulfatkonzentrationen ab 1.8 M und nur bei Proteinkonzentrationen bis 5 mg/ml kristallisiert. Es wurde jedoch keine Bedingung gefunden, bei der die Kristalle gut reproduzierbares Wachstum zeigten.

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde ein zweites Screening entwickelt, das die ermittelten Kristallisationsbedingungen weiter eingrenzte (siehe Tabelle 25).

Die Proteinkonzentrationen betragen 2,3, 4 und 5 mg/ml. Die Tropfen bestanden aus 3 µl Protein, 3 µl Puffer, und das Reservoirvolumen betrug 700 µl.

Tabelle 25: Screening II

Puffer	Ammoniumsulfat	PEG 400 %	Nr.
0.1 M Hepes pH 6.5	1.8 M	1.5	1
		1.75	2
		2	3
	2.0 M	1.5	4
		1.75	5
		2	6
	2.2 M	1.5	7
		1.75	8
		2	9
0.1 M Hepes pH 6.7	1.8 M	1.5	10
		1.75	11
		2	12

Puffer	Ammoniumsulfat	PEG 400 %	Nr.
	2.0 M	1.5	13
		1.75	14
		2	15
	2.2 M	1.5	16
		1.75	17
		2	18
0.1 M Hepes pH 6.9	1.8 M	1.5	19
		1.75	20
		2	21
	2.0 M	1.5	22
		1.75	23
		2	24
	2.2 M	1.5	25
		1.75	26
		2	27
0.1 M Hepes pH 7.1	1.8 M	1.5	28
		1.75	29
		2	30
	2.0 M	1.5	31
		1.75	32
		2	33
	2.2 M	1.5	34
		1.75	35
		2	36

Puffer	Ammoniumsulfat	PEG 400 %	Nr.
0.1 M Hepes pH 7.3	1.8 M	1.5	37
		1.75	38
		2	39
	2.0 M	1.5	40
		1.75	41
		2	42
	2.2 M	1.5	43
		1.75	44
		2	45
0.1 M Hepes pH 7.3	1.8 M	1.5	46
		1.75	47
		2	48
	2.0 M	1.5	49
		1.75	50
		2	51
	2.2 M	1.5	52
		1.75	53
		2	54
0.1 M Hepes pH 7 (Normal Conditions)	2.0 M	2	NC
			0.1 M MgSO ₄
			0.2 M MgSO ₄
			0.1 M Li ₂ SO ₄
			0.2 M Li ₂ SO ₄
			1 % Dioxan

Die Ansätze wurden erneut 5 Tage bei RT kultiviert. Zusätzlich wurden einige Tropfen der Bedingung „Normal Conditions“ (siehe Tabelle 25) bei 32 °C und einer Proteinkonzentration von 2 mg kultiviert. Die Auswertung der Platten bei RT ergab erneut keine Optimalbedingungen zum Wachstum der Vinorin-Synthase-Kristalle. Die Auswertung der Platte bei 32 °C (0.1 M HEPES pH 7, 2.0 M Ammoniumsulfat, PEG 400 2 %) ergab gute Kristallisationsbedingungen. Die Wachstumsbedingungen waren reproduzierbar und die Kristalle ließen sich anfärben (IZIT). Es wurden Röntgenstrahlen-Diffraktions-Daten gesammelt. Mit Messungen an einem Einkreisdiffraktometer mit $\text{CuK}\alpha$ -Strahlung konnte nur eine Auflösung von bis zu 6 Å erzielt werden (siehe Abbildung 45).

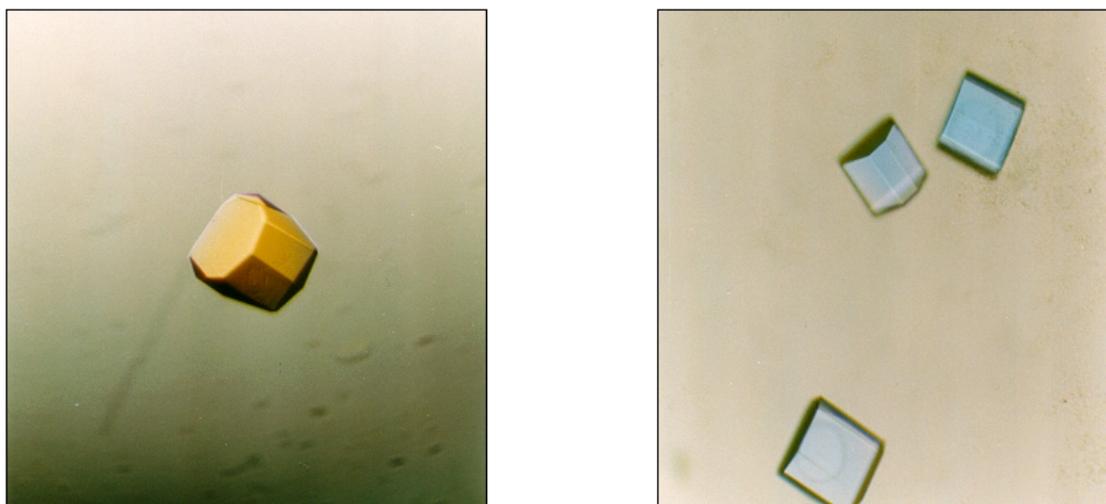


Abbildung 45: Reproduzierbare Kristallisation der Vinorin-Synthase

Bedingung (NC): (0.1 M HEPES pH 7, 2.0 M Ammoniumsulfat, PEG 400 2 %)

Um eine bessere Auflösung zu erzielen, sollten die Kristalle mit Synchrotron-Strahlung vermessen werden. Hierfür wurden Bedingungen für die Messungen der Kristalle bei tiefen Temperaturen (Kryo-Bedingungen) entwickelt. Der für die Experimente entwickelte Kryo-Puffer bestand aus dem jeweiligen Kristallisationspuffer, dem 20 % Glycerol zugesetzt wurde. Vor den Messungen wurden die Kristalle mit einem Nylon-Loop in den Kryo-Puffer transferiert und in einem Strahl mit flüssigem Stickstoff gefroren (Kryo-Kühlsystem). Aufgrund der Stabilität der Kristalle unter „Kryo-Bedingungen“

war es möglich, die Kristalle mit Synchrotronstrahlung zu vermessen. Auch mit Synchrotronstrahlung beugten die Kristalle der „Normal Conditions“-Bedingung nur bis 6 Å. Mit Kristallen der Bedingung 49 des Screening II (0.1 M HEPES pH 7.3, 2.0 M Ammoniumsulfat, 1.5 % PEG 400) (siehe Tabelle 25) konnte dagegen mit Synchrotronstrahlung eine Auflösung von 3.3 Å erzielt werden (Kristallgröße in μm x: 150, y: 200, z: 200). Es wurden Daten in 4 Teildatensätzen bei einer Wellenlänge von 0.84570 Å aufgenommen (siehe Abbildung 46). Nach den vorliegenden Berechnungen (Dr. Köpke, MPI, Frankfurt) gehört der Kristall zur Raumgruppe $P2_12_12_1$ (orthorhombisch primitiv) mit den Zellparametern: $a = 79.6 \text{ \AA}$, $b = 89.7 \text{ \AA}$, $c = 135.3 \text{ \AA}$. Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist noch keine Kristallstruktur eines zur Vinorin-Synthase homologen Proteins bekannt, die als Vergleich für die Aufklärung der Vinorin-Synthase-Struktur hätte herangezogen werden können. Aus diesem Grund war es mit den vorhandenen Informationen bis heute noch nicht möglich, die Proteinstruktur der Vinorin-Synthase aufzuklären.



Abbildung 46: Diffractionsbild eines Vinorin-Synthase-Kristalls (Synchrotronstrahlung)

7.1 Derivatisierung der Vinorin-Synthase mit Selenomethionin

Die Struktur eines Moleküls wird in der Röntgenstrukturanalyse nach Gleichung [2] anhand der Elektronendichtekarte ρ ermittelt. Der Begriff Elektronendichtekarte rührt daher, dass der überwiegende Anteil der Strahlung an den Elektronen der Atomhülle gebeugt wird. Die Streuung von Röntgenstrahlen an den Atomkernen ist vernachlässigbar gering.

$$\rho(\vec{x}) = 1/V \sum_{\vec{h}} |F(\vec{h})| e^{-2\pi i \vec{h} \cdot \vec{x}} \quad [2]$$

Hierbei bezeichnet V das Volumen der Elementarzelle, $\vec{x} = (x, y, z)$ die Ortskoordinaten des direkten Raumes und $\vec{h} = (h, k, l)$ die Millerschen Indizes des reziproken Raumes und F den Strukturfaktor. Der Strukturfaktor besteht aus zwei Komponenten, einer Amplitude und einer Phase. Die detektierten Röntgenreflexe eines Proteinkristalls lassen über die Intensität Rückschlüsse auf die Strukturamplitude der gestreuten Welle zu. Die Phaseninformation geht jedoch durch die Betragsbildung verloren (Scharff 2000) (siehe Gleichung [3]).

$$\sqrt{I} \approx |F(\vec{h})| \quad [3]$$

I = Intensität, F = Strukturamplitude

Nach der Züchtung von Monokristallen besteht in der Regel der nächste Schritt für eine erfolgreiche Strukturaufklärung in der Generierung von Schwermetallatomderivaten (Buerger 1977), (Lottspeich und Zorbas 1998) oder in der multiplen anomalen Dispersion (MAD) zur Lösung des Phasenproblems.

Normalerweise sind die Intensitäten zweier über Inversionssymmetrie verknüpfter Reflexe (Friedel-Paar) identisch. Liegt das Röntgenabsorptionsmaximum eines Metalls wie z.B. Selen in der Nähe der

Wellenlänge des Röntgenstrahls, beteiligen sich die inneren Elektronen am Streuvorgang. Die durch die Phasenverschiebung resultierende anomale Dispersion führt zu unterschiedlichen Intensitäten der Friedel-äquivalenten Reflexe. Die anomale Dispersion der im Protein vorhandenen Atome (H,C,N,O und S) ist bei den üblicherweise verwendeten Wellenlängen der Röntgenstrahlung vernachlässigbar gering. Bei schweren Atomen wie z.B. Selen hingegen ist dieser Effekt messtechnisch erfassbar, vor allem dann, wenn die Wellenlänge des Röntgenstrahls exakt der Absorptionskante des Schwermetalls entspricht. Sind genügend Selenatome in ein Protein inkorporiert worden, kann anhand der anomalen Dispersion das Phasenproblem gelöst werden.

Die Inkorporation der Selenatome in die Vinorin-Synthase ist in 5.1 beschrieben (Van Duyne et al. 1993).

Es wurde versucht, das Selenomethionin-Protein mit den für den Wildtyp optimierten Bedingungen zu kristallisieren. Da es mit den beiden selbstentwickelten Screenings nicht gelang, reproduzierbare Selenomethionin-Kristalle zu erhalten, wurden erneut die Puffer des „Crystal Screen“ und des „Crystal Screen2“ von Hampton Research verwendet. Die mikroskopische Analyse nach 5 Tagen ergab, dass Kristalle bei Bedingungen gewachsen waren, die den optimierten Bedingungen entsprachen, aber kein PEG 400 enthielten. Momentan wird versucht, die Pufferbedingungen ohne PEG 400 so zu optimieren, dass Selenomethionin-Monokristalle ausreichender Größe und Auflösung entstehen. Gelingt dies, könnte die Kristallstruktur der Vinorin-Synthase in absehbarer Zeit aufgeklärt werden.

V DISKUSSION

1 Die Bedeutung der Vinorin-Synthase

Mindestens 10 hoch substratspezifische Enzyme sind an der Biosynthese von Ajmalin, ausgehend von Tryptamin und Secologanin beteiligt (Stöckigt 1995). Die Mehrzahl von ihnen ist bisher identifiziert worden, aber nur fünf Enzyme konnten bis zur Homogenität gereinigt werden. Das Vorliegen einer ausreichenden Menge gereinigten Proteins ist jedoch Voraussetzung für eine genaue Untersuchung der durch ein Enzym katalysierten Reaktion.

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

Die Vinorin-Synthase ist ein wichtiges Schlüsselenzym in der Biosynthese von Ajmalin. Sie katalysiert in einer Acetyl-Coenzym-A-abhängigen Reaktion den C7-C17-Ringschluß vom 16-epi-Vellosimin zum Vinorin, das das erste Alkaloid mit hexazyklischer Ajmalan-Grundstruktur darstellt.

In dieser anspruchsvollen Reaktion laufen formal zwei Teilreaktionen ab. Zum einen wird eine neue C-C-Bindung geschlossen und zum anderen wird eine OH-Gruppe acetyliert.

Der C7-C17-Ringschluß zur Ausbildung des Ajmalan-Skeletts erfolgt bei Alkaloiden des Sarpagin-Typs mit 16(S)-Konfiguration bei pH-Werten unter 4 in einer spontanen Reaktion. Das entstehende Zwischenprodukt ist jedoch instabil und kann nur durch Acetylierung zu einer 17-O-Acetyl-Verbindung abgefangen werden (Bartlett et al. 1963). Die spontane Zyklisierung ist nur bei den von der Vinorin-Synthase akzeptierten Verbindungen 16-epi-Vellosimin und Gardneral, die eine 16(S)-Konfiguration besitzen, zu beobachten. Bei den entsprechenden Epimeren ist das C7-Atom zu weit vom C17-Atom entfernt,

so dass das π -Elektronenpaar der Doppelbindung am carbonylischen Kohlenstoff nicht angreifen kann.

Das natürliche Substrat 16-epi-Vellosimin epimerisiert bei hohen pH-Werten innerhalb von 20 min und wird dann nicht mehr als Substrat akzeptiert. Neben dem natürlichen Substrat wird nur dessen 11-Methoxyderivat Gardneral akzeptiert, welches im Rahmen der vorliegenden Arbeit für alle Enzymassays, die zur Charakterisierung notwendig waren, verwendet wurde. Während 16-epi-Vellosimin bei einem pH-Wert von 7-8 mit einer Halbwertszeit von ca. 20 min epimerisiert, ist bei Gardneral bei gleichen Bedingungen eine Epimerisierung nicht zu beobachten. Die HPLC-Untersuchungen haben gezeigt, dass die Epimerisierung nicht reversibel ist, d.h. nach erfolgter Epimerisierung der Substrate erfolgt keine reverse Epimerisierung zu den 16(S)-Verbindungen.

1.1 Bisherige und aktuelle Forschungsergebnisse

Die Vinorin-Synthase wurde erstmals 1983 von Pfitzner (Pfitzner et al. 1986) beschrieben. Ihm war es gelungen, das Enzym aus *Rauvolfia-serpentina*-Zellsuspensionskulturen anzureichern und zu charakterisieren (Pfitzner 1984). Obitz (Obitz 1995) und Körnig (Körnig 1997) führten die Arbeiten an diesem Enzym fort.

Der erste Enzymtest mit Tritium-markiertem Acetyl-Coenzym zur Bestimmung der Aktivität der Vinorin-Synthase wurde von Pfitzner (Pfitzner et al. 1986) entwickelt. Diese Methode wurde durch Obitz (Obitz 1995) mit der Einführung eines zweistufigen nicht radioaktiven Enzymassays, mit PNA als erstem und 16-epi-Vellosimin als zweitem Substrat, verbessert.

Goldhammer (Goldhammer 2001) schuf dann die Grundlage zur einfachen und schnellen Überprüfung der Vinorin-Synthase-Aktivität durch Entwicklung eines einstufigen, HPLC-basierten Enzymtests. Dieser Test wurde in der vorliegenden Arbeit leicht modifiziert verwendet. Durch Austausch des Tris-Puffers gegen KPi-Puffer konnte eine bessere Trennung der Peaks erreicht werden. Der Test machte es möglich, schnell und einfach die Aktivität der Vinorin-Synthase zu bestimmen.

Basierend auf den Ergebnissen von Pfitzner, Obitz, Körnig und Goldhammer wurde die Vinorin-Synthase aus *Rauvolfia/Rhazya*-Pflanzenzellen erstmals von Dr. I. Gerasimenko und Dr. Y. Sheludko so aufgereinigt, dass Spaltpeptide bestimmt werden konnten. Mit dem in Tabelle 26 dargestellten Reinigungsschema war es gelungen, diese Synthase fast 1000fach anzureichern.

Tabelle 26: Reinigungsschema für die Vinorin-Synthase

	Reinigungsschritt
a.	Herstellung eines Proteinrohextraktes aus 2 kg gefrorenem Zellgewebe aus <i>Rauvolfia/Rhazya</i> -Zellen
b.	Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung (40 – 60 %)
c.	Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q
d.	Hydrophobe Interaktionen Chromatographie an SOURCE 15PHE
e.	Chromatographie an MacroPrep Ceramic Hydroxyapatit
f.	Anionenaustauschchromatographie an Mono Q
g.	Größenausschlußchromatographie an Superdex 75

Das SDS-Gel erhalten mit den Fraktionen nach der Größenausschlußchromatographie ließ mit Hilfe des Aktivitätsprofils der Fraktionen die eindeutige Zuordnung einer als Vinorin-Synthase zu.

Nach Sequenzierung dieser Bande wurden vier Peptidfragmente erhalten. Mit dieser Aminosäure-Sequenzinformation war es erstmals möglich geworden, gezielt nach der Nukleotidsequenz der Vinorin-Synthase zu suchen.

Das Problem war, dass keines der vier Peptidfragmente eine Homologie zu einer bisher bekannten Acetyltransferase aufwies. Somit war zu diesem Zeitpunkt die Frage nicht zu beantworten, wo die Peptidfragmente im Gen der Vinorin-Synthase lokalisiert sein könnten und ob überhaupt die richtige Enzymbande sequenziert worden war.

Da es nicht möglich war, mit den 12 möglichen Oligonukleotid-Primerkombinationen, die aus den vier Peptidfragmenten resultierten, ein

erstes cDNA-Fragment der Vinorin-Synthase zu generieren, musste eine andere Vorgehensweise genutzt werden. Sequenzvergleiche bekannter Acetyltransferasen deckten ein zu 100 % konserviertes Motiv (DFGWG) nahe des C-Terminus dieser Enzyme auf. Es wurde deshalb angenommen, dass die Vinorin-Synthase als Acetyltransferase ebenfalls diese konservierte Region besitzt. Deshalb diente dieser Abschnitt der Primärsequenz als Matrize zur Synthese eines degenerierten reversen Oligonukleotidprimers (Grothe et al. 2001).

Tatsächlich gelang es, durch die Kombination eines degenerierten forward Oligonukleotidprimers, abgeleitet von einem der vier Peptidfragmente, zusammen mit dem degenerierten reversen Primer, ein erstes cDNA-Fragment der Vinorin-Synthase zu amplifizieren. Dieses Fragment zeigte erstmals Homologie zu den oben erwähnten Acetyltransferasen. Da das Fragment kein Start- oder Stopcodon enthielt, wurde mit der Methode der RACE-PCR das 3'- und 5'-Ende des Vinorin-Synthase-Gens amplifiziert. Es resultierte eine 1263 bp lange Nukleotidsequenz mit offenem Leserahmen, die für ein Protein mit 421 Aminosäuren codieren sollte.

Dieses putative Vinorin-Synthase-Gen wurde in den pQE2-Expressionsvektor einligiert. Durch den N-terminalen 6-fachen Histidin-tag, der dem Enzym durch Expression im pQE2-Vektor angefügt wurde, war es nach erfolgter Expression möglich, die Vinorin-Synthase schnell und bis zur Homogenität aufzureinigen. Nach erfolgter Reinigung wurde durch die Bestimmung der Enzymaktivität bestätigt, dass es sich bei dem heterolog exprimierten Enzym tatsächlich um die Vinorin-Synthase handelte.

Ein Inkubations-Ansatz mit nachgewiesener aktiver Vinorin-Synthase führte in Abwesenheit von Acetyl-CoA zu keinem Umsatz des Substrates. Bei der durch die Vinorin-Synthase katalysierten Reaktion handelt es sich demnach eindeutig um einen Acetyl-CoA-abhängigen Mechanismus.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es somit erstmals gelungen, das Enzym Vinorin-Synthase bis zur Homogenität aufzureinigen und mit den danach erhaltenen partiellen Peptidsequenzen durch molekularbiologische Methoden die Nukleotidsequenz zu entschlüsseln.

Die Vinorin-Synthase konnte im mg-Maßstab heterolog in *E. coli* exprimiert und bis zur Homogenität aufgereinigt werden.

Damit waren die Voraussetzungen geschaffen, ausreichend Protein zu produzieren, um das Enzym ausführlich zu charakterisieren und auf molekularer Ebene im Detail zu analysieren.

2 Eigenschaften der Vinorin-Synthase

2.1 Bisherige Forschungsergebnisse

Bei ersten Versuchen zur Charakterisierung der Vinorin-Synthase von Pfitzner (Pfitzner 1984) wurde das Molekulargewicht durch Gelfiltration an einer AcA 54 mit $30.5 \text{ kDa} \pm 10 \%$ bestimmt. Goldhammer (Goldhammer 2001) bestimmte das Molekulargewicht mit Hilfe der Größenausschluß-chromatographie an Superdex 75 mit $43 \text{ kDa} \pm 3 \%$. Der isoelektrische Punkt von pH 4.4 war mit Hilfe der Chromatofokussierung nach Sluytermann (Sluytermann 1978) ermittelt worden. Das Enzym zeigte nach Pfitzner ein Temperaturoptimum von $35 \text{ }^\circ\text{C}$, sowie ein pH-Optimum von 8.5 (Pfitzner et al. 1986).

Bei der Vinorin-Synthase handelt es sich um ein hoch substratspezifisches Enzym. Von den untersuchten Substraten wird neben 16-epi-Vellosimin nur dessen 11-Methoxyderivat Gardneral umgesetzt. Methylierung des Stickstoffs an Position 1 führt dazu, dass die Substanzen nicht mehr als Substrat akzeptiert werden. Dies zeigte, dass die Methylierung an diesem Stickstoff mit Sicherheit zu einem späteren Zeitpunkt im Biosyntheseweg erfolgen muss. Es wurde auch gezeigt, dass Acetyl-CoA das einzige Co-Substrat ist (getestet wurden außerdem Malonyl-CoA, Benzoyl-CoA, Coumaroyl-CoA und Oleoyl-CoA), das die Vinorin-Synthase akzeptiert (Pfitzner et al. 1986).

2.2 Aktuelle Forschungsergebnisse

Während der vorliegenden Arbeit wurde das Molekulargewicht der Vinorin-Synthase mit Hilfe der Größenausschlußchromatographie an Superdex 75 mit 45 kDa \pm 5 % bestimmt. Dieses Ergebnis stimmt mit dem errechneten Molekulargewicht der Vinorin-Synthase von 46 kDa überein und bestätigt die von Goldhammer (Goldhammer 2001) ermittelte Größe. Erstaunlicherweise liegt die per SDS-Gel ermittelte Größe leicht über diesem Wert. Das Ergebnis steht auch im Gegensatz zu den früheren Untersuchungen von Pfitzner (Pfitzner et al. 1986), die ein um 15 kDa geringeres Ergebnis ergaben. Da von Goldhammer die Bestimmung des Molekulargewichtes mehrmals mit der von Pfitzner gebrauchten Methode wiederholt wurde und immer ein Molekulargewicht von 43 kDa \pm 3 % ermittelt wurde, handelte es sich bei dem kleineren Wert eventuell um einen Messfehler. Eine andere Erklärung für den kleineren Wert könnte sein, dass Proteasen das Enzym degradiert hatten.

Alle weiteren Enzymeigenschaften wurden mit dem heterolog exprimierten Enzym bestimmt und können so mit den bisherigen Forschungsergebnissen des nativen Proteins verglichen werden.

Der K_M -Wert bezogen auf das Substrat Gardneral wurde zum einen mit der Vinorin-Synthase mit 6-fachem Histidin-Rest und zum anderen nach Abspaltung des Histidin-Restes bestimmt. Der K_M -Wert der (His)₆Vinorin-Synthase nach Michaelis-Menten wurde bestimmt mit 20 μ M, V_{max} betrug 1 pkat. Der K_M -Wert nach Lineweaver-Burk wurde bestimmt bei 41,2 μ M, V_{max} wurde bei 1.71 pkat ermittelt. Die K_M -Werte stimmen nicht überein.

Alle weiteren Enzymeigenschaften wurden mit der Vinorin-Synthase ohne Histag bestimmt.

Nach erfolgreicher Abspaltung des Histidin-Restes wurde der K_M -Wert nach Michaelis-Menten bestimmt mit 20 μ M, V_{max} betrug 1 pkat. Der K_M -Wert nach Lineweaver-Burk wurde bestimmt bei 41,2 μ M, V_{max} wurde bei 1.71 pkat ermittelt. Die K_M -Werte stimmen nicht überein.

Da der K_M -Wert ein Maß für die Affinität des Enzyms zum Substrat darstellt bedeutet dies, dass der 6-fache Histidin-Rest die Affinität des Enzyms zum

Substrat mindert. Da bisher noch keine 3D-Struktur der Vinorin-Synthase vorliegt, kann auch nicht ausgeschlossen werden, dass der His-tag in der Nähe der Substrat- oder Co-Substrat-Bindungsstelle liegt und aus sterischen Gründen die enzymatische Reaktion beeinträchtigt.

Der K_M -Wert des Co-Substrates wurde mit 60.5 μM und V_{max} mit 0.6 μkat bestimmt. Der K_M -Wert stimmt genau mit dem von Pfitzner ermittelten Wert überein (Pfitzner 1984). Dieser Wert zeigt, dass die Vinorin-Synthase zwar noch eine relativ große Affinität zum Co-Substrat aufweist, die aber jene des Substrates nicht erreicht. Dies würde erklären, warum ein Überschuss an Acetyl-CoA notwendig ist, um eine optimale Vinorin-Synthase-Aktivität zu gewährleisten.

Das Temperatur-Optimum des heterolog exprimierten und homogenen Enzyms liegt bei 35 °C, was dem Ergebnis von Pfitzner entspricht (Pfitzner 1984).

Die Vinorin-Synthase zeigt ihre maximale Aktivität bei einem pH von 7.8 im Gegensatz zu dem von Pfitzner (Pfitzner 1984) ermittelten Wert von pH 8.5. Dieser Unterschied kann auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass Pfitzner andere Puffer zur Bestimmung des pH-Optimums verwendete (Pfitzner et al. 1986). Ein pH-Optimum in dem Bereich zwischen pH 7.5 und 8.5 ist jedoch typisch für Acetyltransferasen pflanzlichen Ursprungs (Walker et al. 2000), (Walker und Croteau 2000), (Dudareva et al. 1998).

Die Vinorin-Synthase ist sehr stabil. Auch nach 10-monatiger Lagerung bei 4 °C in Gegenwart von 10 mM MSH zeigte sich keine signifikante Minderung der Vinorin-Synthase-Aktivität. Die Aktivität des Enzyms wurde auch durch Lagerung bei -20 °C und Gefriertrocknung nicht vermindert. Es wurde getestet, ob die Anwesenheit von 20 mM MSH die katalytische Aktivität der Vinorin-Synthase verändert. Die Anwesenheit von 20 mM MSH führte jedoch zu keiner Verringerung der Enzym-Aktivität. Dies bedeutet, dass keine intra- oder intermolekularen Disulfidbrücken existieren, die eine bedeutende Rolle bei der Formation der 3D-Struktur spielen.

Um erste Informationen über Aminosäuren zu erhalten, die für die katalytische Aktivität essentiell sind, wurde eine Reihe von Inhibitoren, die mit den Aminosäuren Serin, Cystein und Histidin reagieren, getestet.

AEBSF, ein selektiver Serin-modifizierender Wirkstoff, inhibierte die Vinorin-Synthase zu 100 %, während E-64, ein selektiver Cystein-Inhibitor die Aktivität nur um 50 % reduzierte. Inhibierungen zwischen 50 – 100 % waren bei den Serin-Cystein-Inhibitoren TLCK, TPCK und PMSF zu beobachten. Sowohl die Anwesenheit von DEPC (starker, unselektiver Histidin-modifizierender Wirkstoff), als auch von Hg^{2+} -Ionen führt zu einem vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität der Vinorin-Synthase.

Dieses Ergebnis lässt die Aussage zu, dass mindestens ein Histidin der Vinorin-Synthase katalytisch an der Reaktion beteiligt sein könnte.

Außerdem ist es wahrscheinlich, dass die Aminosäuren Serin und vielleicht auch Cystein eine wichtige Rolle bei der durch die Vinorin-Synthase katalysierten Reaktion spielen. Die Anwesenheit eines Cystein-Restes im oder in der Nähe des aktiven Zentrums wurde schon für andere Acetyltransferasen beschrieben (Zaidenzag et al. 1979), (Pompeo et al. 1998). Aufgrund der Ergebnisse der Inhibitor-Studien kommt im Falle der Vinorin-Synthase mit ziemlicher Sicherheit ein Serin-Rest als Mitglied des katalytischen Zentrums in Frage.

Um weitere Aminosäuren zu identifizieren, die möglicherweise am Mechanismus der Reaktion beteiligt sind, wurden Sequenzvergleiche mit bekannten Acetyltransferasen unternommen.

3 Sequenzanalyse der Vinorin-Synthase

Datenbankrecherchen in der *SwissProt*-Datenbank unter Verwendung des FASTA-Sequenzanalyse-Programms zeigten, dass die Vinorin-Synthase zu einer kleinen Familie von Acetyltransferasen gehört (siehe 2.9). Die Familie besteht z.Z. aus 10 Enzymen, die alle an der Biosynthese pharmazeutisch wichtiger Stoffe beteiligt sind. Die N-Hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase aus *Dianthus caryophyllus* wurde 1997 als erstes Enzym der Familie

heterolog exprimiert (Yang et al. 1997). Danach folgten 5 Enzyme der Taxol-Biosynthese (Walker und Croteau 1999), (Walker et al. 2000), (Walker und Croteau 2000), (Walker et al. 2002a), (Walker et al. 2002b) sowie die Salutaridinol-7-O-Acetyltransferase (Grothe et al. 2001), die den letzten Ringschluss der Morphin-Biosynthese katalysiert, eine Acetyltransferase der Vindolin-Biosynthese (St-Pierre et al. 1998) und zuletzt ein Enzym des Phenylpropan-Biosyntheseweges (Hoffmann et al. 2003). Die Existenz einer neuen Familie von Acetyltransferasen wurde erstmals 1998 von St. Pierre postuliert, der die Ähnlichkeit zu Enzymen der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Familie und der Acetyltransferase-Komponente des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes diskutierte (St-Pierre et al. 1998).

Das Molekulargewicht dieser Enzyme liegt zwischen 46 und 54 kDa, so dass die Vinorin-Synthase mit einem Molekulargewicht von 46 KDAa gut in diese Enzymfamilie passt. Bis auf die Primärstruktur ist nur wenig über diese kleine Enzymfamilie bekannt.

Alle Enzyme weisen ein DFGWG-Motiv, nahe des C-Terminus, und ein HxxxD-Motiv, etwa in der Mitte der Proteinsequenz, auf.

Diese beiden Motive sind auch bei weiteren Acetyltransferasen zu finden: der Chloramphenicol-Acetyltransferase (Lewendon et al. 1994), der Acetyltransferase-Komponente des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes (Reed und Hackert 1990), (Hendle et al. 1995), der Cholin-Acetyltransferase (Carbini und Hersh 1993) und der Carnitin-Palmitoyltransferase (Brown et al. 1994).

Diese auffälligen Sequenz-Ähnlichkeiten legen die Vermutung nahe, dass die konservierten Aminosäuren am Reaktionsmechanismus der Enzyme beteiligt sind und die Acetyltransferasen deshalb alle einen ähnlichen katalytischen Reaktionsmechanismus haben könnten.

Hendle postulierte aufgrund von Kristallstrukturanalysen 1995 zwei Klassen von Acetyltransferasen (Hendle et al. 1995): eine Klasse mit einem katalytisch essentiellen Histidin-Asparagin-Paar wie bei der Dihydrolipoamid-Acetyltransferase und eine Klasse mit einer Histidin-Aspartat-Arginin-Triade, wie sie bei den Chloramphenicol-Transferasen nachgewiesen worden war (Leslie 1990). Die Strukturaufklärung der Arylamin-N-Acetyltransferasen (NAT-Familie) (Sinclair et al. 2000) deckte durch Kristallstrukturanalysen eine

katalytische Cystein-Histidin-Aspartat-Triade auf, wie sie auch bei den Cystein-Proteasen vorhanden ist. Bei den Serin-Proteasen wird das Cystein durch ein Serin ersetzt (Kitadokoro et al. 1994).

Das am besten charakterisierte Beispiel für Enzyme mit katalytischen Triaden ist das der Serin-Proteasen, insbesondere des Chymotrypsins (Steitz und Shulman 1982). In diesem Fall wird Serin 195 durch Histidin 57 mit Hilfe von Aspartat 102 deprotoniert, was den nukleophilen Angriff des Serin-Hydroxyl-Sauerstoffs auf den Substrat-Kohlenstoff erleichtert. Als Zwischenprodukt ist der Carboxylteil der Peptidbindung kovalent an Serin 195 als Ester gebunden und der abgespaltene Aminoteil kann das aktive Zentrum im Tausch gegen Wasser verlassen. Wasser hydrolysiert nun den entstandenen Serin-Ester. Dabei assistieren wiederum Histidin und Aspartat, indem sie diesmal die Nucleophilie des Wassers erhöhen.

Die oben erwähnten Inhibitor-Studien an der Vinorin-Synthase weisen darauf hin, dass wahrscheinlich ein Serin und möglicherweise ein Cystein, neben einem Histidin, an der katalytischen Reaktion beteiligt sind.

Es wäre also durchaus möglich, dass bei der Vinorin-Synthase und den anderen Enzymen der Familie eine katalytische Triade existiert.

Da bei allen erwähnten Acetyltransferasen das HxxxD-Motiv vorhanden ist, könnte es sich bei diesen zwei Aminosäuren um einen Teil der katalytischen Triade handeln. Außerdem haben alle Mitglieder der Familie mehrere Serine und Cysteine konserviert.

Um die Theorie der katalytischen Triade zu bestätigen, müssten durch Mutation die beteiligten Aminosäuren Serin/Cystein-Histidin-Aspartat identifiziert werden. Würden sie gegen eine neutrale Aminosäure ausgetauscht, müssten diese Mutationen zum vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms führen.

Kinetische Untersuchungen von Pfitzner zeigten eindeutig, dass beide Substrate (Gardneral und Acetyl-CoA) gleichzeitig am aktiven Zentrum des Enzyms unter Bildung eines ternären Komplexes gebunden sein müssen. Dabei erfolgt die Bindung der beiden Substrate an das aktive Zentrum nicht in

einer bestimmten Reihenfolge, sondern unabhängig voneinander nach einem sogenannten „random BiBi Mechanism“.

Im Falle einer katalytischen Triade könnte dies bedeuten, dass es nach Bindung des Co-Substrates an die Vinorin-Synthase zu einer Umesterung des Acetylrestes auf einen Serin- oder Cystein-Rest des Enzyms kommt. Die Nukleophilie des Serins/Cysteins wäre durch das Histidin im katalytischen Zentrum, welches als Base fungieren würde, erhöht. Anschließend würde die Acetylgruppe vom Cystein/Serin-Rest auf die OH-Gruppe des 17-Deacetyl-Vinorin übertragen (Goldhammer 2001).

Um die Theorie der katalytischen Triade zu überprüfen wurden alle konservierten Serine, Cysteine, Histidine und Aspartate, die die Vinorin-Synthase-Familie aufweist, gegen Alanin ausgetauscht und die Aktivität der Mutanten untersucht. Besser wäre natürlich ein Austausch der zu untersuchenden Aminosäure gegen eine Aminosäure, die strukturell ähnlich ist und der lediglich die funktionelle Gruppe fehlt (z.B. Asparaginsäure gegen Asparagin). Auf diese Weise wäre ein Aktivitätsverlust eindeutig auf das Fehlen der funktionellen Gruppe zurückzuführen und nicht auf eventuelle Änderungen in der Faltstruktur des Enzyms, bedingt durch den Größenunterschied der Aminosäuren. Um die Mutationen einheitlich zu gestalten, wurden aber alle ausgewählten Aminosäuren gegen die neutrale Aminosäure Alanin ausgetauscht. Diese Aminosäure besitzt keine funktionellen Gruppen, kann keine Wechselwirkungen eingehen und ist somit meistens die Aminosäure der Wahl bei Mutationen (Brown et al. 1994). Theoretisch müsste, bei auftretendem Aktivitätsverlust durch den Austausch von Asparaginsäure gegen Alanin, auch ein Austausch gegen eine Aminosäure gleicher Größe ohne funktionelle Gruppe wie z.B. Asparagin erfolgen, falls die kinetischen Daten der einzelnen Muteine quantitativ miteinander verglichen werden sollten.

4 Mutationen der Vinorin-Synthase

Um die für den Reaktionsmechanismus essentiellen Aminosäuren zu identifizieren, wurden zuerst die folgenden sechs Aminosäuren jeweils gegen Alanin ausgetauscht: Serin 29, Cystein 89, Cystein 149, Histidin 160, Asparagin 293, Serin 413.

Nach erfolgreicher Mutation wurden die Mutanten exprimiert und gereinigt. Anschließend wurden die Enzymaktivitäten gemessen und die K_M -Werte ermittelt. Die Bestimmung von K_M -Werten ist für eine Enzymcharakterisierung von grundlegender Bedeutung, da Aussagen zur Affinität des Enzyms zum Substrat gemacht werden können. Ein hoher K_M -Wert bedeutet, dass eine hohe Substratkonzentration erforderlich ist, um Halbsättigung des Enzyms mit Substrat zu erzielen. Das Enzym hat zu dem entsprechenden Substrat keine hohe Affinität. Der K_M -Wert ist eine charakteristische Konstante für jedes Enzym, nicht jedoch V_{max} , da V_{max} in jedem Einzelfall von der vorhandenen Enzymkonzentration abhängt. Enzyme bei denen die Umsatzgeschwindigkeit nicht hyperbol von der Substratkonzentration abhängt sondern sigmoid entsprechen nicht der Michaelis-Menten-Kinetik. Hier können der K_M -Wert und V_{max} nicht auf dem üblichen Weg ermittelt werden und es wird daher von einem apparenten K_M -Wert gesprochen.

Die K_M -Werte der Mutationen S29A und C149A weichen stark von dem des Wildtyps ab. Der K_M -Wert der Mutante H160A war nicht zu bestimmen, da das mutierte Enzym durch einen 100 %igen Aktivitätsverlust charakterisiert ist (siehe Tabelle 21).

Die Mutationen Asn293A, S413A und C89A führten zu keiner Veränderung des K_M -wertes im Vergleich zum Wildtyp. Die Aminosäure S413 liegt ganz am Ende der Vinorin-Synthase-Sequenz und ist nicht konserviert. Ihr wurde keine katalytisch essentielle Funktion zugesprochen und die Mutation diene somit lediglich als Kontrolle.

Interessanterweise nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit der Mutanten C89A und S413A sigmoid mit der Substratkonzentration zu und nicht hyperbol wie beim Wildtyp. Bei einem solchen Verhalten lässt sich die Michaelis-Menten-

Darstellung nicht linearisieren. Es können lediglich apparente K_M - und V_{max} -Werte aus der sigmoiden Kurve abgelesen werden. Bei einem solchen sigmoiden Verhalten könnte es sich um einen positiven kooperativen Effekt handeln. Positive Kooperativität bedeutet, dass mit zunehmender Substratkonzentration die Geschwindigkeit zunächst überproportional ansteigt und sich dann erst hyperbolisch dem Maximalwert nähert. Von einem kooperativen Effekt spricht man in der Regel, wenn ein Protein nicht als Monomer vorliegt und sich die Untereinheiten hinsichtlich der Bindungsfähigkeit gegenseitig beeinflussen. Da die Vinorin-Synthase ein monomeres Enzym ist, lässt sich das sigmoide Verhalten der zwei Mutanten nicht durch einen positiv kooperativen Effekt erklären.

Eine andere Erklärung für eine sigmoide Kurve wären Verunreinigungen des Enzyms oder Substrats, die sich als reversibler Inhibitor des Enzyms auswirken könnten. Da jedoch alle Mutanten gleich behandelt wurden, müsste dieses Phänomen bei allen Mutanten auftreten, was nicht der Fall ist.

Eine weitere Erklärung ist die sogenannte kinetische Kooperativität. Die Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes und die Umwandlung des Enzyms in seine aktive Form wir hier zum geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (slow transition model). Wenn sowohl die aktive als auch die inaktive Form des Enzyms, wenn auch mit unterschiedlicher Effizienz, in der Lage sind, das Substrat zum Produkt umzuwandeln, so resultiert dies in einer sigmoiden Kinetik.

Es könnte auch sein, dass der Ringschluss bei der Bildung des Vinorins nicht spontan abläuft, sondern von der Vinorin-Synthase abhängt. Vielleicht wird durch die Mutation die Konformation des Enzyms so geändert, dass die Bindungsfähigkeit für das Substrat abnimmt. Es könnte sein, dass der sonst schnelle Ringschluss dadurch verlangsamt wird. Dieser Effekt würde ein sigmoides Verhalten der Mutanten erklären.

Der völlige Aktivitätsverlust der Mutante H160A beweist, dass das basische Histidin, das bisher alle bekannten Acetyltransferasen im Motiv HxxxD aufweisen, unverzichtbar ist für die katalytische Aktivität des Enzyms.

Die Mutationen S29A und C149A zeigen eine deutlich herabgesetzte relative Aktivität im Vergleich zum Wildtyp (siehe Tabelle 23). Der Austausch von

Serin an Position 29 gegen Alanin resultiert in einem Aktivitätsverlust von 75 % im Vergleich zum Wildtyp. Der Austausch von Cystein 149 gegen Alanin resultiert in einer Mutante, die nur noch 10 % der Aktivität des Wildtyps aufweist.

Dieses Resultat lässt vermuten, dass der K_M -Wert bei beiden Mutationen eigentlich deutlich steigen müsste. Das Gegenteil ist jedoch der Fall. Niedrige Substratkonzentrationen ergeben einen relativ hohen Umsatz zum Produkt. Erhöht man jedoch die Substratkonzentration, so steigt der Umsatz nicht weiter an, was der Kinetik des Wildtyps widerspricht. Ab einer sehr niedrigen Konzentration an Substrat (ca. 7 μM) bleibt der Umsatz fast konstant, völlig im Gegensatz zum Wildtyp, bei dem der Umsatz bis zu Substratkonzentrationen von 40 μM ansteigt.

Diese Kinetik resultiert in niedrigen K_M -Werten. Der K_M -Wert von S29A wurde mit 4.65 μM bestimmt und der K_M -Wert von C149A mit 1.06. Im Endeffekt bedeutet dieses Resultat, dass die Affinität der Mutanten zum Substrat zwar sehr hoch, der Umsatz jedoch sehr niedrig ist.

In diesem Fall sind die Mutanten S29A und C149A nur in der Lage, einen geringen Anteil Gardneral zum Produkt umzuwandeln. Der Grund hierfür könnte sein, dass einmalig Co-Substrat an alles vorhandene Enzym gebunden wird. Die Acetylgruppe wird auf das Substrat übertragen, aber die Mutation könnte das Enzym in dem Maße verändert haben, dass das Co-Substrat nicht mehr vom Enzym freigelassen werden kann. Somit könnte kein neues Co-Substrat binden, und es findet kein Umsatz zum Produkt mehr statt. Dies würde auch die mehr oder weniger konstante Menge an Produkt erklären, die unabhängig von der eingesetzten Menge an Substrat entsteht.

Als Ergebnis dieser ersten Mutationsexperimente lässt sich sagen, dass S89 und C149 wichtig für die Enzymaktivität der Vinorin-Synthase sind, eventuell als Co-Substrat-Bindungsstellen. Es handelt sich jedoch nicht um Mitglieder der katalytischen Triade, da die Mutationen nicht zum vollständigen Aktivitätsverlust führten. Im Gegensatz dazu wurde, wie bereits erwähnt, durch den Austausch von Histidin an Position 160 gegen Alanin eine Aminosäure identifiziert, die an der Reaktion im katalytischen Zentrum eine

essentielle Rolle spielt. Die Mutanten C89A und S413A zeigen eine sigmoide Reaktionskinetik.

Um die zwei noch fehlenden Mitglieder einer erwarteten katalytischen Triade zu identifizieren, wurden alle noch verbleibenden konservierten Serine und Aspartate gegen Alanin ausgetauscht (S^{16,68,243}, D^{32,164,359,361}). Da das Substrat Gardneral nur in begrenzter Menge zur Verfügung steht und es lediglich darum ging, Aminosäuren zu identifizieren, deren Austausch in einem vollständigen Aktivitätsverlust resultiert, wurde bei diesen Experimenten auf die Bestimmung der K_M -Werte verzichtet. Nach erfolgreicher Mutation, Expression und Aufreinigung wurden die Aktivitäten der Mutanten, bei identischer Proteinkonzentration ins Verhältnis zur Aktivität des Wildtyps gesetzt (relative Aktivität).

Das Ergebnis, dargestellt in Tabelle 23 zeigt, dass die Mutanten S68A und D359A zu keiner Verminderung der Enzymaktivität im Vergleich zum Wildtyp führen. Auch die Mutation S16A führt zu keiner signifikanten Veränderung.

Die Mutation des Aspartats 361 aus dem DFGWG-Motiv resultiert in einer Verminderung der Aktivität um 65 %, so dass davon ausgegangen werden kann, dass diese Aminosäure zwar an der Reaktion der Vinorin-Synthase beteiligt sein muss, sich jedoch nicht im katalytischen Zentrum befindet. Das Gleiche gilt für die Mutationen D32A (32 % relative Aktivität) und S243A (17 % relative Aktivität).

Interessanterweise führt die Mutation des Aspartats 164 zum vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms. Somit sind beide konservierten Aminosäuren des HxxxD-Motivs im katalytischen Zentrum der Vinorin-Synthase an der Reaktion beteiligt.

Nach Austausch aller vorhandenen konservierten Serine und Cysteine konnte hingegen kein Serin oder Cystein gefunden werden, das die katalytische Triade vervollständigen würde. Um zu überprüfen, ob die Aminosäuren, die veränderte K_M -Werte aufweisen oder in einer reduzierten Enzymaktivität resultieren an der Co-Substrat-Bindung beteiligt sind, müssten die K_M -Werte der Mutanten mit dem Co-Substrat Acetyl-CoA bestimmt werden.

Brown (Brown et al. 1994) postulierte für das Enzym Carnitin Palmitoyltransferase einen Mechanismus, der das Ergebnis der Mutationsexperimente der Vinorin-Synthase erklären könnte.

Obwohl von den Autoren zuerst eine katalytische Triade angenommen wurde, konnte durch Mutationsversuche bewiesen werden, dass dies nicht der Fall ist. Stattdessen sind nur ein Histidin und ein Aspartat an der Reaktion beteiligt. In Analogie zum Mechanismus der Serin-Proteasen wird durch das Histidin, zusammen mit dem Aspartat, die Deprotonierung der Carnitin-Hydroxylgruppe erreicht. Dies erhöht die Nukleophilie der Carnitin-Hydroxylgruppe und ermöglicht den Angriff am Carbonyl-Kohlenstoff der Palmitoyl-CoA-Thioester-Bindung. Dies führt zur Übertragung der Acylgruppe auf Carnitin unter Freisetzung von Coenzym-A. Kinetische Untersuchungen zeigten, dass ein Acyl-Enzym-Intermediat wie bei den Serin-Proteasen unwahrscheinlich ist (Brown et al. 1994), (Nic a' Bhaird et al. 1993). Außerdem zeigten die Mutationsexperimente das kein Serin vorhanden ist, das als Mitglied einer katalytischen Triade in Frage käme.

Eine Möglichkeit für den Mechanismus der Bildung von Vinorin aus 16-epi-Vellosimin wäre, dass die Zelle bei der Bildung von Vinorin auf die spontane Bildung von 17-Deacetyl-Vinorin zurückgreift (Goldhammer 2001). Die Acetylierung durch die Vinorin-Synthase könnte in einer Reaktion die der von Brown beschriebenen analog ist stattfinden und das Gleichgewicht durch das Acetylieren der zyklisierten Verbindung zugunsten des Ajmalan-Gerüsts verschieben. Es wurde jedoch kein Serin-Rest im katalytischen Zentrum identifiziert, der für die Bildung eines Acetyl-Enzym-Intermediats notwendig wäre. Somit ist eindeutig, dass die Acetylgruppe des Co-Substrats nicht als Ester im katalytischen Zentrum gebunden wird.

Solange aber die räumliche Struktur der Vinorin-Synthase oder wenigstens eines anderen Enzyms der kleinen Acetyltransferase-Familie nicht aufgeklärt ist, lässt sich über den Reaktionsmechanismus nur spekulieren. Es bleibt aber festzuhalten, dass die hier diskutierten Ergebnisse eine katalytische Triade im aktiven Zentrum der Vinorin-Synthase und möglicherweise auch der anderen

Familienmitglieder eindeutig ausschließen. Eine Röntgenstrukturanalyse könnte den Mechanismus aufklären.

5 Kristallisation und Strukturaufklärung der Vinorin-Synthase

Die Kenntnis der räumlichen Beschaffenheit, besonders die der aktiven Zentren und Bindungsstellen, ist unverzichtbar für das ursächliche Verstehen der Funktionen der Proteine. Um mittels Röntgenstrukturanalyse den dreidimensionalen Aufbau der Vinorin-Synthase zu klären, musste das Enzym kristallisiert werden. Nur durch Aufklärung des räumlichen Aufbaus der Vinorin-Synthase wäre es möglich, den Reaktionsmechanismus dieser und möglicherweise auch verwandter Acetyltransferase aufzuklären.

Wie in Kapitel 7 beschrieben, war es nach Optimierung der Kristallisationsbedingungen gelungen, die Vinorin-Synthase mit der hanging-drop-Methode reproduzierbar zu kristallisieren.

Mit Kristallen, die mit dem Kristallisationspuffer 0.1 M HEPES pH 7.3, 2.0 M Ammoniumsulfat, 1.5 % PEG 400 gewachsen waren, konnte mit Synchrotronstrahlung eine Auflösung von 3.3 Å erzielt werden. Berechnungen zufolge gehört der Kristall zur Raumgruppe $P2_12_12_1$ (Kristall-System: orthorhombisch) mit den Zellparametern: $a = 79.6 \text{ \AA}$, $b = 89.7 \text{ \AA}$, $c = 135.3 \text{ \AA}$.

Die meisten Proteinkristalle unterschiedlichster Familien gehören dieser Raumgruppe an. Da bis jetzt kein Protein kristallisiert wurde, das genügend Homologie zur Vinorin-Synthase aufweist, ist es mit den bis jetzt vorhandenen Informationen nicht möglich, die Struktur des Enzyms, z.B durch Homology-Modeling, aufzuklären.

Eine Möglichkeit, das Phasenproblem zu lösen und so die Struktur der Vinorin-Synthase aufzuklären, ist die Methode der multiplen anomalen Dispersion (MAD) (Thomazeau et al. 2001) (siehe 7.1).

Bei dieser Untersuchung wurden die 10 Methionine der Vinorin-Synthase gegen Selenomethionin ausgetauscht. Die Inkorporation der Selenatome in das Enzym ist in Kapitel 5.1 beschrieben. Da es mit den für den Wildtyp optimierten Bedingungen nicht gelang, mit Selenomethionin derivatisierte Kristalle zu erhalten, musste erneut aufwendig gescreent werden, um

geeignete Kristallisationsbedingungen zu finden. Die Bedingungen, bei denen das mit Selenomethionin modifizierte Enzym kristallisierte, entsprachen genau denen der Wildtyp-Kristallisation mit der Ausnahme des Fehlens von PEG 400. Dieser Präzipitant hat offensichtlich einen hemmenden Einfluss auf das Kristallisationsverhalten des mit Selenomethionin modifizierten Enzyms.

Eine Erklärung für die verminderte Kristallisationsbereitschaft und die veränderten Kristallisationsbedingungen könnte sein, dass die Struktur des Enzyms durch den Einbau der relativ großen Anzahl von 10 Selenatomen deutlich verändert ist gegenüber der des Wildtyps. Immerhin hat Selen eine größere Atommasse von 78.9 im Vergleich zur relativen Atommasse des Schwefels von 32.

Der nächste Untersuchungsschritt wird die Röntgenstrukturanalyse der gewachsenen „Selenomethionin-Kristalle“ sein. Mit Hilfe der dreidimensionalen Struktur könnten die Ergebnisse der Mutationsversuche überprüft und der molekulare Mechanismus dann aufgeklärt werden.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Reinigung, heterologen Expression, Charakterisierung, molekularen Analyse, Mutation und Kristallisation des Enzyms Vinorin-Synthase.

Das Enzym spielt eine wichtige Rolle in der Ajmalin-Biosynthese, da es in einer Acetyl-CoA-abhängigen Reaktion die Umwandlung des Sarpagan-Alkaloids 16-epi-Vellosimin zu Vinorin unter Bildung des Ajmalan-Grundgerüsts katalysiert.

Nach der Reinigung der Vinorin-Synthase aus Hybrid-Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina/Rhazya stricta* mit den fünf chromatographischen Trennmethoden Anionenaustauschchromatographie an SOURCE 30Q, Hydrophobe Interaktionen Chromatographie an SOURCE 15PHE, Chromatographie an MacroPrep Ceramic Hydroxyapatit, Anionenaustauschchromatographie an Mono Q und Größenausschlusschromatographie an Superdex 75 konnte die Vinorin-Synthase aus 2 kg Zellkulturgewebe 991fach angereichert werden.

Das nach der Reinigung angefertigte SDS-Gel ermöglichte eine klare Zuordnung der Protein-Bande als Vinorin-Synthase.

Der Verdau der Enzymbande mit der Endoproteinase LysC und die darauffolgende Sequenzierung der Spaltpeptide führte zu vier Peptidsequenzen. Der Datenbankvergleich (SwissProt) zeigte keinerlei Homologien zu Sequenzen bekannter Pflanzenenzyme. Mit degenerierten Primern, abgeleitet von einem der erhaltenen Peptidfragmente und einer konservierten Region bekannter Acetyltransferasen gelang es, ein erstes cDNA-Fragment der Vinorin-Synthase zu amplifizieren. Mit der Methode der RACE-PCR wurde die Nukleoidsequenz vervollständigt, was zu einem cDNA-Vollängenklon mit einer Größe von 1263 bp führte, der für ein Protein mit 421 Aminosäuren (46 kDa) codiert.

Das Vinorin-Synthase-Gen wurde in den pQE2-Expressionsvektor ligiert, der für einen N-terminalen 6-fachen His-tag codiert. Anschließend wurde sie

erstmals erfolgreich in *E. coli* im mg-Maßstab exprimiert und bis zur Homogenität gereinigt.

Durch die erfolgreiche Überexpression konnte die Vinorin-Synthase eingehend charakterisiert werden. Der K_M -Wert für das Substrat Gardneral wurde mit 20 μM , bzw. 41.2 μM bestimmt und V_{max} betrug 1 pkat, bzw. 1.71 pkat. Nach erfolgreicher Abspaltung des His-tags wurden die kinetischen Parameter erneut bestimmt (K_M - Wert 7.5 μM , bzw. 27.52 μM , V_{max} 0.7 pkat, bzw. 1.21 pkat). Das Co-Substrat zeigt einen K_M - Wert von 60.5 μM (V_{max} 0.6 pkat). Die Vinorin-Synthase besitzt ein Temperatur-Optimum von 35 °C und ein pH-Optimum bei 7.8.

Homologievergleiche mit anderen Enzymen zeigten, dass die Vinorin-Synthase zu einer noch kleinen Familie von bisher 10 Acetyltransferasen gehört. Alle Enzyme der Familie haben ein HxxxD und ein DFGWG-Motiv zu 100 % konserviert. Basierend auf diesen Homologievergleichen und Inhibitorstudien wurden 11 in dieser Proteinfamilie konservierte Aminosäuren gegen Alanin ausgetauscht, um so die Aminosäuren einer in der Literatur postulierten katalytischen Triade (Ser/Cys-His-Asp) zu identifizieren.

Die Mutation aller vorhandenen konservierten Serine und Cysteine resultierte in keiner Mutante, die zum vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms führte. Nur die Mutationen H160A und D164A resultierten in einem vollständigen Aktivitätsverlust des Enzyms. Dieses Ergebnis widerlegt die Theorie einer katalytischen Triade und zeigte, dass die Aminosäuren H160A und D164A exklusiv an der katalytischen Reaktion beteiligt sind.

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse und zur vollständigen Aufklärung des Reaktionsmechanismus wurde die Vinorin-Synthase kristallisiert. Die bis jetzt erhaltenen Kristalle (Kristallgröße in μm x: 150, y: 200, z: 200) gehören der Raumgruppe $P2_12_12_1$ (orthorhombisch primitiv) an und beugen bis 3.3 Å. Da es bis jetzt keine Kristallstruktur eines zur Vinorin-Synthase homologen Proteins gibt, konnte die Struktur noch nicht vollständig aufgeklärt werden. Zur Lösung des Phasenproblems wird mit der Methode der multiplen anomalen Dispersion (MAD) jetzt versucht, die erste Kristallstruktur in dieser Enzymfamilie aufzuklären.

VII LITERATURVERZEICHNIS

- Bartlett, M. F., Lambert, B. F., Werblood, H. M. und Taylor, W. I. (1963). "Rauwolfia Alkaloids XLIII. A facile ring closure of Deoxyajmalal A to Deoxyajmaline." *J. Am. Soc.* **85**: 475-477.
- Bartlett, M. F., Sklar, R., Taylor, W. I., Schlittler, E., Amai, R. L. S., Beak, P., Bringi, N. V. und Wenkert, E. (1962). "Rauwolfia Alkaloids XXXVIII. Stereospecific degradation leading to the absolute configurations and structure of ajmaline, sarpagine and corynantheidine." *J. Am. Chem. Soc.* **84**: 622-630.
- Barton, D. H. R., Kirby, G. W., Prager, R. H. und Wilson, E. M. (1965). "On the origin of the C-1 fragment in the indole alkaloids." *J. Chem. Soc.*: 3990-3994.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513-1523.
- Blakesly, R. W. und Boezi, J. A. (1977). "A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250." *Anal. Biochem.* **82**: 580-582.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Brown, N. F., Anderson, R. C., Caplan, S. L., Foster, D. W. und McGarry, J. D. (1994). "Catalytically important domains of rat carnitine palmitoyltransferase II as determined by site-directed mutagenesis and chemical modification. Evidence for a critical histidine residue." *J. Biol. Chem.* **269**: 19157-19162.
- Buerger, M. (1977). *Kristallographie*. Kristallographie. Berlin New York, Walter de Gruyter.
- Carbini, L. A. und Hersh, L. B. (1993). "Functional analysis of conserved histidines in choline acetyltransferase by site-directed mutagenesis." *J. Neurochem.* **61**: 247-253.

- Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W. und Laemmli, U. K. (1977). "Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis." *J. Biol. Chem.* **252**: 1102-1106.
- Dogru, E., Warzecha, H., Seibel, F., Haebel, S., Lottspeich, F. und Stockigt, J. (2000). "The gene encoding polyneuridine aldehyde esterase of monoterpenoid indole alkaloid biosynthesis in plants is an ortholog of the alpha/betahydrolase super family." *Eur. J. Biochem.* **267**: 1397-1406.
- Dudareva, N., D'Auria, J. C., Nam, K. H., Raguso, R. A. und Pichersky, E. (1998). "Acetyl-CoA: benzylalcohol acetyltransferase - an enzyme involved in floral scent production in *Clarkia breweri*." *Plant J.* **14**: 297-304.
- Fahn, J. und Stöckigt, J. (1990). "Purification of Acetyl-CoA: 17-O-Acetylvindoline 17-O-Acetyltransferase from *Catharanthus roseus* leaves." *Plant Cell Rep.*: 613-616.
- Falkenhagen, H. und Stöckigt, J. (1995). "Enzymatic biosynthesis of vomilenine a key intermediate of the ajmaline pathway, catalyzed by a novel cytochrome P450 dependent enzyme from plant cell cultures of *Rauvolfia serpentina*." *Z. Naturforsch.* **50c**: 45-53.
- Fermi, G., Perutz, M. F., Shaanan, B. und Fourme, R. (1984). "The crystal structure of human deoxyhaemoglobin at 1.74 Å resolution." *J. Mol. Biol.* **175**: 159-174.
- Ficner, R. (1998). Röntgenstrukturanalyse. Bioanalytik. F. Lottspeich and H. Zorbas. Heidelberg Berlin, Spektrum Akademischer Verlag: 451-463.
- Ficner, R. und Huber, R. (1993). "Refined crystal structure of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* at 0.23-nm resolution and localization of the gamma subunit." *Eur. J. Biochem.* **218**: 103-106.
- Ficner, R., Lobeck, K., Schmidt, G. und Huber, R. (1992). "Isolation, crystallization, crystal structure analysis and refinement of B-phycoerythrin from the red alga *Porphyridium sordidum* at 2.2 Å resolution." *J. Mol. Biol.* **228**: 935-950.
- Gao, S., von Schumann, G. und Stöckigt, J. (2002). "A newly detected reductase from *Rauvolfia* closes a gap in the biosynthesis of the

- therapeutically applied antiarrhythmic alkaloid ajmaline." *Planta Med.* **68**: 906-911.
- Gerasimenko, I., Sheludko, Y., Ma, X. und Stockigt, J. (2002). "Heterologous expression of a *Rauvolfia* cDNA encoding strictosidine glucosidase, a biosynthetic key to over 2000 monoterpenoid indole alkaloids." *Eur. J. Biochem.* **269**: 2204-2213.
- Goldhammer, A. (2001). Reinigung der Vinorin-Synthase aus Zellkulturen von *Rauvolfia serpentina*. Pharmazeutische Biologie. Mainz, Johannes Gutenberg-Universität.
- Grothe, T., Lenz, R. und Kutchan, T. M. (2001). "Molecular characterization of the salutaridinol 7-O-acetyltransferase involved in morphine biosynthesis in opium poppy *Papaver somniferum*." *J. Biol. Chem.* **276**: 30717-30723.
- Hammes, B. und Stöckigt, J. "unveröffentlichte Ergebnisse."
- Hanahan, D. (1985). Techniques for transformation in *E. coli*. DNA Cloning Volume I - A practical Approach. D.M. Glover. Oxford Washington D.C., IRL Press.
- Hauschild, K., Pauli, H. H. und Kutchan, T. M. (1998). "Isolation and analysis of a gene *bbe1* encoding the berberine bridge enzyme from the California poppy *Eschscholzia californica*." *Plant. Mol. Biol.* **36**: 473-478.
- Hendle, J., Mattevi, A., Westphal, A. H., Spee, J., de Kok, A., Teplyakov, A. und Hol, W. G. (1995). "Crystallographic and enzymatic investigations on the role of Ser558, His610, and Asn614 in the catalytic mechanism of *Azotobacter vinelandii* dihydrolipoamide acetyltransferase (E2p)." *Biochem.* **34**: 4287-4298.
- Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1988). "Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels." *Electrophoresis* **9**: 28-32.
- Hickman, A. B., Klein, D. C. und Dyda, F. (1999). "Melatonin biosynthesis: the structure of serotonin N-acetyltransferase at 2.5 Å resolution suggests a catalytic mechanism." *Mol. Cell.* **3**: 23-32.

- Hoffmann, L., Maury, S., Martz, F., Geoffroy, P. und Legrand, M. (2003). "Purification, cloning, and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism." *J. Biol. Chem.* **278**: 95-103.
- Jensen, L. B., Hammerum, A. M. und Aarestrup, F. M. (2000). "Linkage of vat(E) and erm(B) in streptogramin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from Europe." *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 2231-2232.
- Jogl, G. und Tong, L. (2003). "Crystal structure of carnitine acetyltransferase and implications for the catalytic mechanism and fatty acid transport." *Cell* **112**: 113-122.
- Kitadokoro, K., Tsuzuki, H., Okamoto, H. und Sato, T. (1994). "Crystal structure analysis of a serine proteinase from *Streptomyces fradiae* at 0.16-nm resolution and molecular modeling of an acidic-amino-acid-specific proteinase." *Eur. J. Biochem.* **224**: 735-742.
- Kleinsorge, H. (1959). "Klinische Untersuchungen über die Wirkungsweise des Rauwolfia-Alkaloids Ajmalin bei Herzrhythmus-Störungen, insbesondere bei Extrasystole." *Med. Klinik* **54**: 409-412.
- Koepke, J., Scharff, E. I., Lucke, C., Ruterjans, H. und Fritsch, G. (2002). "Atomic resolution crystal structure of squid ganglion DFPase." *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **58**: 1757-1759.
- Körnig, T. (1997). Reinigung und Sequenzierung des Enzyms Vinorin-Synthase. Pharmazeutische Biologie. Mainz, Johannes Gutenberg-Universität.
- Kostenyuk, I. A., Lubaretz, O., Borisyuk, N., Voronin, V., Stöckigt, J. und Gleba, Y. (1991). "Isolation and characterization of intergeneric somatic hybrids in the Apocynaceae family." *Theor. Appl. Genet.* **82**: 713-716.
- Krivacic, J. und Rupley, J. A. (1968). "Comparison of protein structure in the crystal and in solution. VI. Volume change in the crystallization of horse methemoglobin." *J. Mol. Biol.* **35**: 483-488.
- Kutchan, T. M. (1989). "Expression of enzymatically active cloned strictosidine synthase from the higher plant *Rauwolfia serpentina* in *Escherichia coli*." *FEBS Letters* **257**: 127-130.

- Kutchan, T. M. (1993). "Strictosidine: from alkaloid to enzyme to gene." *Phytochem.* **32**: 493-506.
- Kutchan, T. M., Hampp, N., Lottspeich, F., Beyreuther, K. und Zenk, M. (1988). "The cDNA clone for strictosidine synthase from *Rauvolfia serpentina*. DNA sequence determination and expression in *Escherichia coli*." *FEBS Letters* **237**: 40-44.
- Leete, E. (1960). "Biogenesis of the *Rauvolfia* alkaloids I." *J. Am. Chem. Soc.*: 6338-6342.
- Lehmann, H. und Ban, T. (1997). "The History of the Psychopharmacology of Schizophrenia." *Can. J. Psychiatry* **42**: 152-162.
- Leslie, A. G. (1990). "Refined crystal structure of type III chloramphenicol acetyltransferase at 1.75 Å resolution." *J. Mol. Biol.* **213**: 167-186.
- Lewendon, A., Murray, I. A., Shaw, W. V., Gibbs, M. R. und Leslie, A. G. (1994). "Replacement of catalytic histidine-195 of chloramphenicol acetyltransferase: evidence for a general base role for glutamate." *Biochem.* **33**: 1944-1950.
- Linsmaier, E. M. und Skoog, F. (1965). "Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures." *Physiol. Plant.* **18**: 100-127.
- Lottspeich, F. und Zorbas, H. (1998). *Proteinreinigung. Bioanalytik.* F Lottspeich and H Zorbas. Heidelberg Berlin, Spektrum Akademischer Verlag: 9-35.
- Lundblad, R. L. (1991). *Chemical Reagents for Protein Modification.* Boca Raton Ann. Harbour Boston London, CRC Press.
- Miles, E. W. (1977). "Modification of histidyl residues in proteins by diethylpyrocarbonate." *Methods Enzymol.* **47**: 431-442.
- Mintz, G. R. (1993). "Technical Note: An irreversible serine protease inhibitor." *Biopharm.* **6**: 34-38.
- Morishige, T., Tsujita, T., Yamada, Y. und Sato, F. (2000). "Molecular characterization of the S-adenosyl-L-methionine:3'-hydroxy-N-methylcoclaurine 4'-O-methyltransferase involved in isoquinoline alkaloid biosynthesis in *Coptis japonica*." *J. Biol. Chem.* **275**: 23398-23405.

- Müller, I., Schlittler, E. und Bein, H. (1955). "Reserpin, der sedative Wirkstoff aus *Rauwolfia serpentina* Benth." *Experientia* **8**: 338.
- Mullis, K. B. (1990). "Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction." *Ann. Biol. Clin.* **48**: 579-582.
- Nagakura, N., Rüffer, M. und Zenk, M. (1979). "The biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids from strictosidine." *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*: 2308-2312.
- Nic a' Bhaird, N., Kumaravel, G., Gandour, R. D., Krueger, M. J. und Ramsay, R. R. (1993). "Comparison of the active sites of the purified carnitine acyltransferases from peroxisomes and mitochondria by using a reaction-intermediate analogue." *Biochem. J.* **294 (Pt 3)**: 645-651.
- Obitz, P. (1995). *Enzyme der Ajmalin-Biosynthese aus Zellkulturen von *Rauwolfia serpentina**. Pharmazeutische Biologie. Mainz, Johannes Gutenberg-Universität.
- Pauli, H. H. und Kutchan, T. M. (1998). "Molecular cloning and functional heterologous expression of two alleles encoding (S)-N-methylcoclaurine 3'-hydroxylase (CYP80B1), a new methyl jasmonate-inducible cytochrome P-450-dependent mono-oxygenase of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis." *Plant J.* **13**: 793-801.
- Pfützner, A. (1984). *Die Biosynthese Der *Rauwolfia*-Alkaloide Sarpagin und Ajmalin*. Pharmazeutische Biologie. München.
- Pfützner, A., Polz, L. und Stöckigt, J. (1986). "Properties of vinorine synthase - the *Rauwolfia* enzyme involved in the formation of the ajmaline skeleton." *Z. Naturforsch.* **41c**: 103-114.
- Pfützner, A. und Stöckigt, J. (1983a). "Characterization of polyneuridine aldehyde esterase, a key enzyme in the biosynthesis of sarpagine/ajmaline type alkaloids." *Planta Med.* **48**: 221-227.
- Pfützner, A. und Stöckigt, J. (1983b). "Polyneuridine aldehyde esterase: an unusually specific enzyme involved in the biosynthesis of sarpagine/ajmaline type alkaloids." *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*: 449-460.

- Pfützner, A. und Zenk, M. (1989). "Homogeneous strictosidine synthase isoenzymes from cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*." *Planta Med.* **55**: 525-530.
- Plumier, P. C. (1703). *Nova Plantarum Americanarum Genera*. Parisiis, Apud Joannem Boudot.
- Polz, L., Schübel, H. und Stöckigt, J. (1987). "Characterisation of 2 β -(R)-17-O-Acetyljmalan: Acetylerase - a specific enzyme involved in the Biosynthesis of the *Rauvolfia* alkaloid ajmaline." *Z. Naturforsch.* **42**: 333-342.
- Pompeo, F., van Heijenoort, J. und Mengin-Lecreulx, D. (1998). "Probing the role of cysteine residues in glucosamine-1-phosphate acetyltransferase activity of the bifunctional GImU protein from *Escherichia coli*: site-directed mutagenesis and characterization of the mutant enzymes." *J. Bacteriol.* **180**: 4799-4803.
- Reed, L. J. und Hackert, M. L. (1990). "Structure-function relationships in dihydrolipoamide acyltransferases." *J. Biol. Chem.* **265**: 8971-8974.
- Robinson, R. (1955). "Further Observations on the Chemistry of Ajmaline." *Chem. Ind.*: 285-286.
- Rodrigues-Lima, F., Delomenie, C., Goodfellow, G. H., Grant, D. M. und Dupret, J. M. (2001). "Homology modelling and structural analysis of human arylamine N-acetyltransferase NAT1: evidence for the conservation of a cysteine protease catalytic domain and an active-site loop." *Biochem. J.* **356**: 327-334.
- Rosco, A., Pauli, H. H., Priesner, W. und Kutchan, T. M. (1997). "Cloning and heterologous expression of NADPH-cytochrome P450 reductases from the Papaveraceae." *Arch. Biochem. Biophys.* **348**: 369-77.
- Rueffer, M., Kan-Fan, C., Husson, H. P. und Stöckigt, J. (1978). "Strictosidine, the common precursor for monoterpenoid indole alkaloids with 3 α and 3 β configuration." *Tetrahedron Letters*: 1593-1596.
- Sahu, B. N. (1979). *Rauvolfias*. New Delhi, Today's and Tomorrow's Printer's and Publishers.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). "Primer-directed enzymatic

- amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." *Science* **239**: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. J. Sambrook, E.F. Fritsch and T Maniatis. New York, Cold Spring Harbour Press.
- Sammons, D. W., Adams, L. D. und Nishizawa, E. E. (1981). "Ultrasensitive silver-based colour staining of polypeptides in polyacrylamide gels." *Electrophoresis* **2**: 135-140.
- Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 5463-5467.
- Scharff, E. I., Koepke, J., Fritsch, G., Lucke, C. und Ruterjans, H. (2001a). "Crystal structure of diisopropylfluorophosphatase from *Loligo vulgaris*." *Structure* **9**: 493-502.
- Scharff, E. I., Lucke, C., Fritsch, G., Koepke, J., Hartleib, J., Dierl, S. und Ruterjans, H. (2001b). "Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of DFPase from *Loligo vulgaris*." *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **57**: 148-149.
- Scharff, I. (2000). *Expression, Struktur und Untersuchungen zum Reaktionsmechanismus der Diisopropylfluorophosphatase aus *Loligo vulgaris**. Fachbereich Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie. Frankfurt, Johann Wolfgang Goethe-Universität.
- Schmeller, T. und Wink, M. (1998). *Utilization of alkaloids in modern medicine*. Alkaloids. M. F. Roberts and M. Wink. New York London, Plenum Press: 435-459.
- Schmidt, D. und Stöckigt, J. (1995). "Enzymatic formation of the sarpagan-bridge: a key step in the biosynthesis of sarpagine- and ajmaline-type alkaloids." *Planta Med.* **61**: 254-258.
- Schübel, H., Ruyter, C. M. und Stöckigt, J. (1989). "Improved production of raucaffricine by cultivated *Rauvolfia* cells." *Phytochem.* **28**: 491-494.
- Schübel, H. und Stöckigt, J. (1986). "Partial purification and characterisation of raucaffricine β -D-glucosidase from plant cell-suspension cultures of *Rauvolfia serpentina*." *Benth. Helv. Chim. Acta* **69**: 538-547.

- Schütz, W. (1996). Pharmakologie des kardiovaskulären Systems: das Herz. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. W. Forth, D. Henschler, W. Rummel and K. Starke. Heidelberg Berlin Oxford, Spektrum Akademischer Verlag: 363-406.
- Shapiro, A. L., Vinuela, E. und V., M. J. (1967). "Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels." Biochem. Biophys. Res. Commun. **28**: 815-820.
- Sheludko, Y., Gerasimenko, I. und Platonova, O. (2000). "Divergence of the indole alkaloid pattern in two somatic hybrid plant cell subcultures of *Rauvolfia serpentina* x *Rhazya stricta*." Planta Med. **66**: 656-659.
- Sinclair, J. C., Sandy, J., Delgoda, R., Sim, E. und Noble, M. E. (2000). "Structure of arylamine N-acetyltransferase reveals a catalytic triad." Nat. Struct. Biol. **7**: 560-564.
- Sluytermann, L. A. (1978). "Chromatofocusing: isoelectric focusing on ion-exchange columns. I. General principles." J. Chromatogr. **150**: 17-30.
- Springob, K., Lukacin, R., Ernwein, C., Groning, I. und Matern, U. (2000). "Specificities of functionally expressed chalcone and acridone synthases from *Ruta graveolens*." Eur. J. Biochem. **267**: 6552-6559.
- Steitz, T. A. und Shulman, R. G. (1982). "Crystallographic and NMR studies of the serine proteases." Annu. Rev. Biophys. Bioeng. **11**: 419-444.
- Stöckigt, J. (1995). Biosynthesis In *Rauvolfia serpentina*. Modern Aspects Of An Old Medicinal Plant. The Alkaloids. G.A. Cordell. San Diego, Academic Press. **47**.
- Stöckigt, J., Pfitzner, A. und Firl, J. (1981). "Indole alkaloids from cell suspension cultures of *Rauvolfia serpentina* Benth." Plant Cell Rep. **1**: 36-39.
- Stöckigt, J., Pfitzner, A. und Keller, P. I. (1983). "Enzymatic formation of Ajmaline." Tetrahedron Letters **24**: 2485-2486.
- Stöckigt, J. und Zenk, M. (1977a). "Isovincoside (strictosidine), the key intermediate in the enzymatic formation of indole alkaloids." FEBS Letters **79**: 233-237.
- Stöckigt, J. und Zenk, M. (1977b). "Strictosidine (isovincoside): the key intermediate in the enzymatic formation the biosynthesis of

- monoterpenoid indole alkaloids." J. Chem. Soc. Chem. Commun.: 646-648.
- St-Pierre, B., Laflamme, P., Alarco, A.-M. und De Luca, V. (1998). "The terminal O-Acetyltransferase involved in vindoline biosynthesis defines a new class of proteins responsible for coenzyme A-dependent transfer; deacetylvindoline 4-O-acetyltransferase from *Catharanthus roseus*." Plant J. **14**: 703-713.
- Sugantino, M. und Roderick, S. L. (2002). "Crystal structure of Vat(D): an acetyltransferase that inactivates streptogramin group A antibiotics." Biochem. **41**: 2209-2216.
- Thomas, J. M. (1993). "Architecture of the invisible." Nature **364**: 478-482.
- Thomazeau, K., Curien, G., Thompson, A., Dumas, R. und Biou, V. (2001). "MAD on threonine synthase: the phasing power of oxidized selenomethionine." Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. **57**: 1337-1340.
- Umezawa, H. und Aoyagi, T. (1983). Protease Inhibitors: Medical and Biological Aspects. N. Katunuma, H. Umezawa and H. Holzer. Berlin, Japan Scientific Societies Press/Springer-Verlag: pp. 25.
- Unterlinner, B., Lenz, R. und Kutchan, T. M. (1999). "Molecular cloning and functional expression of codeinone reductase: the penultimate enzyme in morphine biosynthesis in the opium poppy *Papaver somniferum*." Plant J. **18**: 465-475.
- Van Duyne, G. D., Standaert, R. F. und Karplus, P. A. (1993). "Atomic structures of the human immunophilin FKBP-12 complexes with FK506 and rapamycin." J. Mol. Biol. **229**: 105-124.
- Vazquez-Flota, F., De Carolis, E., Alarco, A. und De Luca, V. (1997). "Molecular cloning and characterization of desacetoxylvindoline-4-hydroxylase, a 2-oxoglutarate dependent-dioxygenase involved in the biosynthesis of vindoline in *Catharanthus roseus*." Plant Mol. Biol. **34**: 935-948.
- von Schumann, G., Gao, S. und Stöckigt, J. (2002). "Vomilenine reductase - a novel enzyme catalysing a crucial step in the biosynthesis of the

- therapeutically applied antiarrhythmic alkaloid ajmaline." *Bioorg. Med. Chem.* **10**: 1913-1918.
- Walker, K. und Croteau, R. (1999). "Molecular cloning of a 10-deacetylbaocatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 583-587.
- Walker, K. und Croteau, R. (2000). "Taxol biosynthesis: Molecular cloning of a benzoyl-CoA:taxane 2 α -O-benzoyltransferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 13591-13596.
- Walker, K., Fujisaki, S., Long, R. und Croteau, R. (2002a). "Molecular cloning and heterologous expression of the C-13 phenylpropanoid side chain-CoA acyltransferase that functions in Taxol biosynthesis." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 12715-12720.
- Walker, K., Long, R. und Croteau, R. (2002b). "The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C13-side-chain N-benzoyltransferase from *Taxus*." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**: 9166-9171.
- Walker, K., Schoendorf, A. und Croteau, R. (2000). "Molecular cloning of a taxa-4(20),11(12)-dien-5 α -ol-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli*." *Arch. Biochem. Biophys.* **374**: 371-380.
- Warzecha, H., Obitz, P. und Stöckigt, J. (1999). "Purification, partial amino acid sequence and structure of the product of raucaffricine-O- β -D-glucosidase from plant cell cultures of *Rauvolfia serpentina*." *Phytochem.* **50**: 1099-1109.
- Weber, K. und Osborn, M. (1969). "The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis." *J. Biol. Chem.* **244**: 4406-4412.
- White, P. A., Stokes, H. W. und Bunny, K. L. (1999). "Characterisation of a chloramphenicol acetyltransferase determinant found in the chromosome of *Pseudomonas aeruginosa*." *FEBS Microbiol. Lett.* **175**: 27-35.

- Yang, Q., Reinhard, K., Schiltz, E. und Matern, U. (1997). "Characterization and heterologous expression of hydroxycinnamoyl/benzoyl-CoA: anthranilate N-hydroxycinnamoyl/benzoyltransferase from elicited cultures of carnation, *Dianthus caryophyllus* L." *Plant Mol. Biol.* **35**: 777-789.
- Zaidenzag, Y., Fitton, J. E., Packmann, L. C. und Shaw, W. V. (1979). "Characterization and comparison of chloramphenicol acetyltransferase variants." *Eur. J. Biochem.* **100**: 609-618.